ZUR BIOSYNTHESE DER STEROIDSAPOGENINE

Einbau und Radioaktivitätsverteilung von [3-^{14}C]- und [2-^{14}C]-Mevalonat in T i g o g e n i n .

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Raymond A. Joly

aus Basel, Noiraigue &
Travers (Kt. Neuenburg)

1967

Z U R B I O S Y N T H E S E D E R
S T E R O I D S A P O G E N I N E

Einbau und Radioaktivitätsverteilung von [3-^{14}C]- und [2-^{14}C]-Mevalonat in T i g o g e n i n .

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Raymond A. Joly

aus Basel, Noiraigue &
Travers (Kt. Neuenburg)

Basel, 1967

Druck: Paul Jllg. Photo-Offsetdruck, Stuttgart.

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren Dr. Ch. Tamm
Dr. C.A. Grob

Basel, den 24. Oktober 1967

Prof. Dr. H. Huber
Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien des chemischen Instituts für organische Chemie der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Ch. Tamm möchte ich an dieser Stelle für das grosse Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat, für die stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0034

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
THEORETISCHER TEIL	1
I. EINLEITUNG	2
1. Digitalis - Ein kurzer Abriss	2
1.1. Systematik	2
1.2. Oekologie	3
1.3. Medizinische Anwendung	3
1.4. Anfänge der chemischen Untersuchung	4
1.5. Definition der Saponine	4
1.6. Herkunft und Isolierung der Saponine	5
2. Biosynthese der Steroide	7
2.1. Allgemeines	7
2.2. Biosynthese der Cardenolide	12
II. BIOSYNTHESE DER STEROIDSAPOGENINE (= SPIROSTANOLE)	17
1. Problemstellung	17
2. Isolierung der radioaktiven Cardenolide und Spirostanole aus Digitalis lanata EHRH.	20
2.1. Fütterungsversuche mit [3-^{14}C]-D,L-Ammonium-Mevalonat	20
2.2. Fütterungsversuche mit [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton	24

Seite

3. Vorversuche zum Abbau von Tigogenin 28

3.1. Beschaffung des inaktiven Materials 28

3.2. Abbau von Tigogenin zur Erfassung der C-Atome Nr. 22-27 34

4. Verteilung der Radioaktivität in Tigogenin nach Einbau von [3-^{14}C]-D,L-Mevalonat 44

5. Verteilung der Radioaktivität in Tigogenin nach Einbau von [2-^{14}C]-D,L-Mevalonat 49

5.1. Einleitung 49

5.1.1. Soyasapogenol-D 52

5.1.2. Lupeol 53

5.1.3. Plumierid 54

5.1.4. Verbenalin und Aucubin 55

5.2. Abbauversuche 56

6. Diskussion der Resultate 60

EXPERIMENTELLER TEIL 64

1. Allgemeines 65

2. Extraktion der inaktiven Spirostanole (= Sapogenine) aus Digitalis lanata EHRH. 67

2.1. Extraktion der Saponine 67

2.2. Hydrolyse des Saponingemisches 68

2.3. Isolierung von Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin 68

Seite

3. Isolierung von [^{14}C]-Tigogenin, [^{14}C]-Gitogenin und [^{14}C]-Digitogenin nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton 71

4. Abbau von inaktivem Tigogenin 74

5. Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach Verabreichung von [3-^{14}C]-D,L-Ammonium-mevalonat 85

5.1. Erste Versuchsreihe 85

5.2. Zweite Versuchsreihe 87

6. Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton 89

ZUSAMMENFASSUNG 93

LITERATURVERZEICHNIS 97

CURRICULUM VITAE 105

THEORETISCHER TEIL

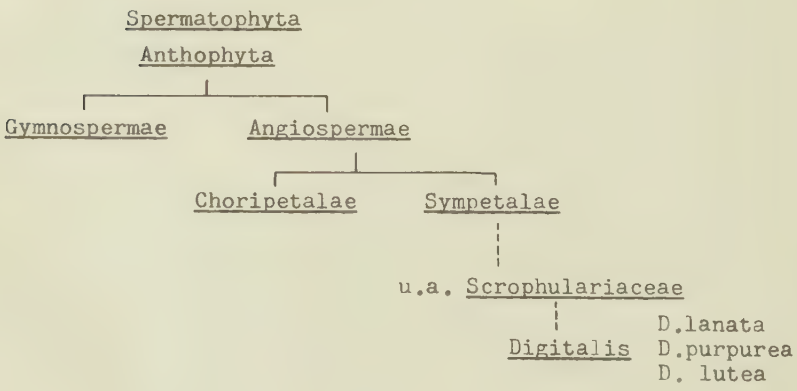
I. EINLEITUNG

1. Digitalis - Ein kurzer Abriss

1.1. Systematik

Innerhalb der Vielzahl von Blütenpflanzen, der Anthophyta, auch unter dem Begriff Samenpflanzen bekannt, nimmt die Familie der Rachenblütler, der Scrophulariaceae, vom medizinischen Standpunkt aus, einen wichtigen Platz ein. Die Gattung Digitalis gehört nach der botanischen Systematik zur Familie der Scrophulariaceae, welche zur Unterklasse der Sympetalae gezählt wird. Die Sympetalae lassen sich, zusammen mit den Choripetalae zur Klasse der Dicotyledonae zusammenfassen. Die Dicetyledonae bilden ihrerseits in der grossen Abteilung der Blütenpflanzen (Anthophyta) oder Samenpflanzen (Spermatophyta) die Unterabteilung der Angiospermae.

Systematik



1.2. Oekologie

Die grosse Zahl der heute bekannten Arten von Digitalis sind weit verbreitet in Europa; ihre Ausdehnung reicht bis weit nach Mittelasien. Bevorzugte Arten von Digitalis sind vor allem Digitalis purpurea (= roter Fingerhut), Digitalis lanata (= wolliger Fingerhut), der in den Kalkgebirgen Griechenlands beheimatet ist, Digitalis lutea, Digitalis grandiflora, Digitalis mertonensis und weitere mehr. In unsern Gegenden tritt der Fingerhut häufig wild wachsend auf, doch wird er wegen seiner medizinischen Bedeutung auch in Kulturen angebaut. Die Digitalis-Arten finden nicht zuletzt wegen ihrer Blütenpracht und Farbe als Zierpflanzen grossen Anklang [1].

Digitalis-Pflanzen sind zweijährige Pflanzen, Pflanzen also, die im ersten Jahr eine Blattrosette ausbilden, und erst im zweiten Jahr zum Blühen kommen.

1.3. Medizinische Anwendung

Schon im frühen Mittelalter waren die Wirkungen der in den Digitalispflanzen vorhandenen Wirkstoffe (Glykoside) erkannt worden. Aeusserlich angewendet wurden Digitalispräparate in der Wundbehandlung. Grössern Nutzen erlangten die Präparate in der innern Medizin. Wie der Ausdruck "herzwirksame Glykoside" besagt, fanden verschiedene Digitalispräparate in der Herztherapie Anwendung. Auch die gefürchtete "Wassersucht" wurde mit Erfolg bekämpft. Es war der Genialität des schottischen Arztes William Withering zu verdanken, dass schon 1785 verschiedene Digitalispräparate in der Herztherapie eingeführt wurden, wodurch der Medizin gerade auf diesem Gebiete neue Mittel und Wege der Heilung aufgezeigt wurden [3].

1.4. Anfänge der chemischen Untersuchung

Die chemischen Untersuchungen der herzaktiven Stoffe wurden schon zu Beginn des letzten Jahrh. in Angriff genommen (Destouches 1808, Homolle und Quevenne 1842). Nativelle war es 1869 als Erstem geglückt, ein ziemlich reines Glykosid in kristalliner Form, das "Digitaline cristallisée", zu isolieren. In verschiedenen andern Arbeiten von Schmiedeberg, Cloetta, Kiliani und Krafft wurde die Isolierung neuer Glykoside beschrieben.

Die ersten Einblicke in die Struktur der Herzglykoside wurden 1910 von Windaus gewonnen. In den Jahren 1922-1934 beschäftigte sich W.A. Jacobs intensiv mit der Chemie der Herzglykoside.

An seine Arbeiten schlossen sich Untersuchungen von A. Stoll, T. Reichstein und R. Tschesche an [2] [3].

1.5. Definition der Saponine

Mehrere Digitalis-Species (Digitalis purpurea, Digitalis lanata, Digitalis lutea) enthalten neben den herzwirksamen Glykosiden eine nicht minder bedeutsame Substanzklasse, die Saponine. Unter dem Sammelbegriff Saponine versteht man pflanzliche Glykoside, die in Wasser einen seifenähnlichen Schaum erzeugen.

Saponinpräparate kamen als Waschdetergentien, als Schaumbildner in Feuerlöschgeräten und Betäubungsmittel (Fischgifte) in den Handel. Auch war die harntreibende und abführende Wirkung verschiedener Saponinpräparate in der Medizin bekannt. Ihre Toxizität beruht auf einer haemolytischen Wirkung.

1.6. Herkunft und Isolierung der Saponine

Schmiedeberg isolierte 1875 das erste Saponin, welches er Digitonin nannte. Er hatte gefunden, dass Digitalispräparate neben den Herzglykosiden auch Saponine enthalten. 1913 folgte durch A. Windaus und A. Schneckenburg die Entdeckung eines weitern Saponins, des Gitonins. W.A. Jacobs und E.E. Fleck isolierten 1930 ein neues Aglykon, das Tigogenin. R. Tschesche fand 1935 das entsprechende Glykosid Tigogenin in Extrakten aus Digitalis lanata. Es wurden aber auch Saponine aus Pflanzen isoliert, die nicht zur Gattung Digitalis gehören, z. B. aus der mexikanischen Sarsaparilla-Wurzel (Sarsasapogenin), aus mexikanischen Lilienarten, Dioscorea-Species (Diosgenin), aus Yucca-Species (Yuccagenin, Smilagenin) etc. In der folgenden Tabelle 1 sind die wichtigsten Vertreter der Sapogenine (Spirostanole) aufgeführt.

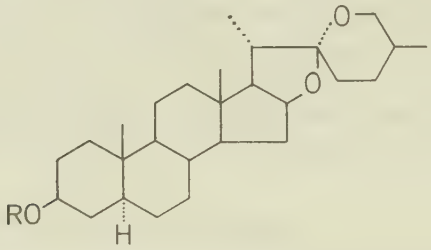
Tabelle 1

Zusammenstellung der wichtigsten Sapogenine *)

Saponin	Sapogenin	Vorkommen
Tigonin	Tigogenin	Digitalis lanata
Gitonin	Gitogenin	Digitalis purpurea, Digitalis lanata
Digitonin	Digitogenin	Digitalis purpurea, Digitalis lanata
Sarsasaponin	Sarsasapogenin	Radix sarsaparillae Yucca schottii
Yucconin	Yuccagenin	Yucca schottii (Wurzel)
Smilonin	Smilagenin	Yucca schottii (Blüten)
Kammonin	Kammogenin	Yucca schottii (Blüten)

Saponin	Sapogenin	Vorkommen
Dioscin	Diosgenin	Dioscorea tokoro, Dioscorea spiculiflora
Trillarin	Diosgenin	Trillium erectum
Trillin	Diosgenin	Trillium erectum

Mit der Strukturaufklärung der Saponine beschäftigten sich besonders H. Kiliani, A. Windaus, W.A. Jacobs und R. Tschesche. Die für die Saponine charakteristische Spiroketal-Gruppierung im Sapogenin-Teil wurde in den Dreis-



R=H : Tigogenin

sigerjahren von Marker et al. in den U.S.A. bewiesen. Die Stereochemie dieses Ringsystems wurde allerdings erst viel später abgeklärt (vgl. [2] [3]).

Bevor wir uns dem Problem der Biogenese der Sapogenine in Digitalis lanata EHRH. zuwenden, wollen wir im folgenden den Stand der Kenntnisse über die Biosynthese der Steroide im allgemeinen sowie der digitaloiden Lactone und Spirostanole im speziellen kurz zusammenfassen.

---

*) Aus L.F. FIESER & M. FIESER "Steroide" 894 (1961).

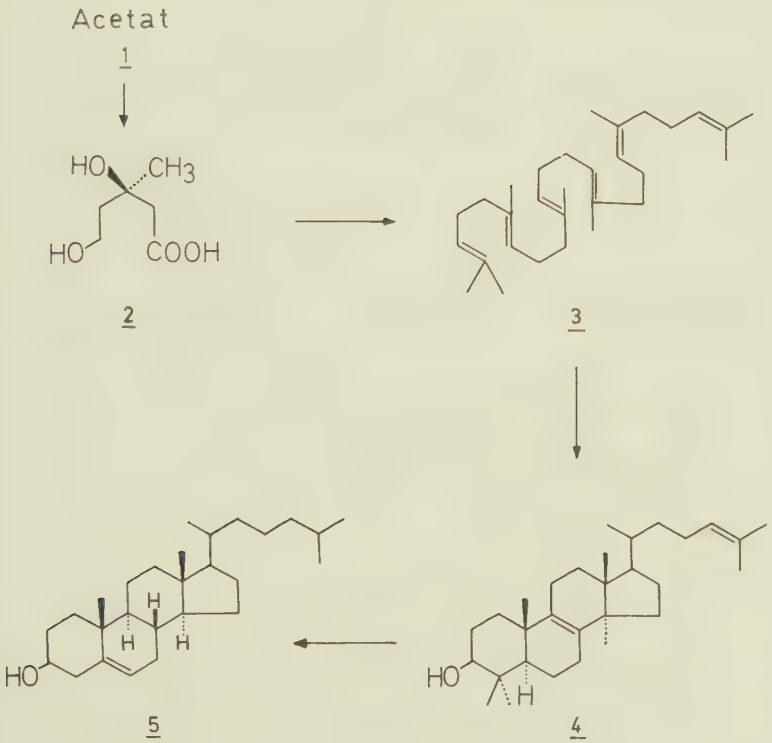
2. Biosynthese der Steroide

2.1. Allgemeines

Die Biosynthese der Steroide im menschlichen und tierischen Organismus ist in den vergangenen Jahren eingehend untersucht worden. So ist für die Bildung des Cholesterols (5) aus Acetat (1) der Weg über Mevalonsäure (2) - Squalen (3) - Lanosterol (4) gut fundiert (Formelschema 1) [4].

Formelschema 1

Biosynthese von Cholesterol aus Acetat

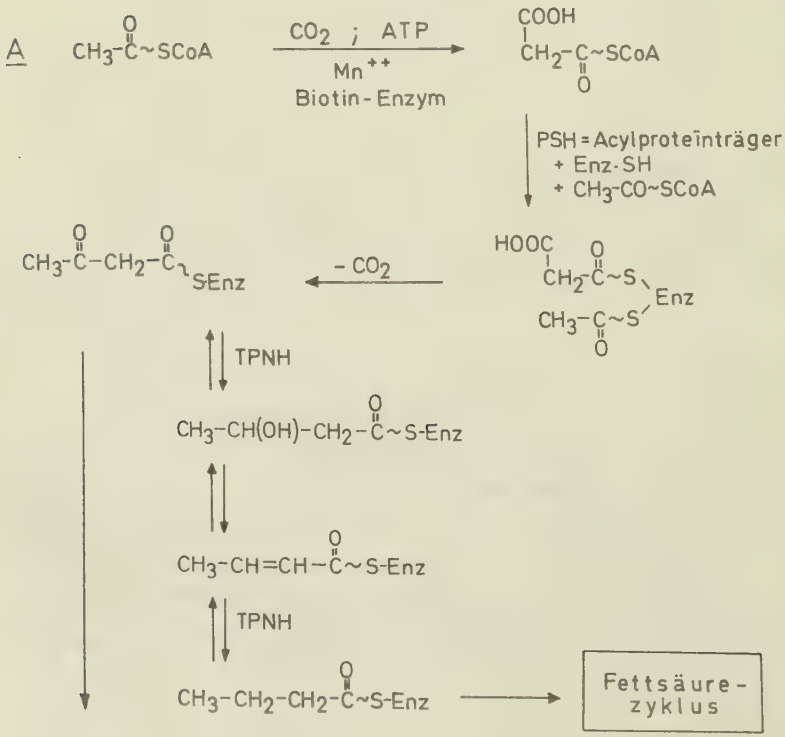


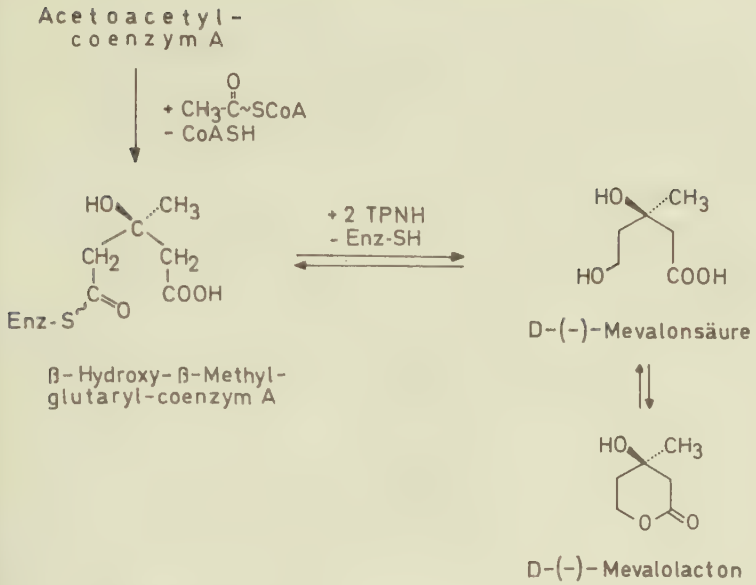
Ebenso ist die Biogenese des wohl wichtigsten Grundbausteines der Natur - der Mevalonsäure - aus Acetat abgeklärt (Formelschema 2) [5].

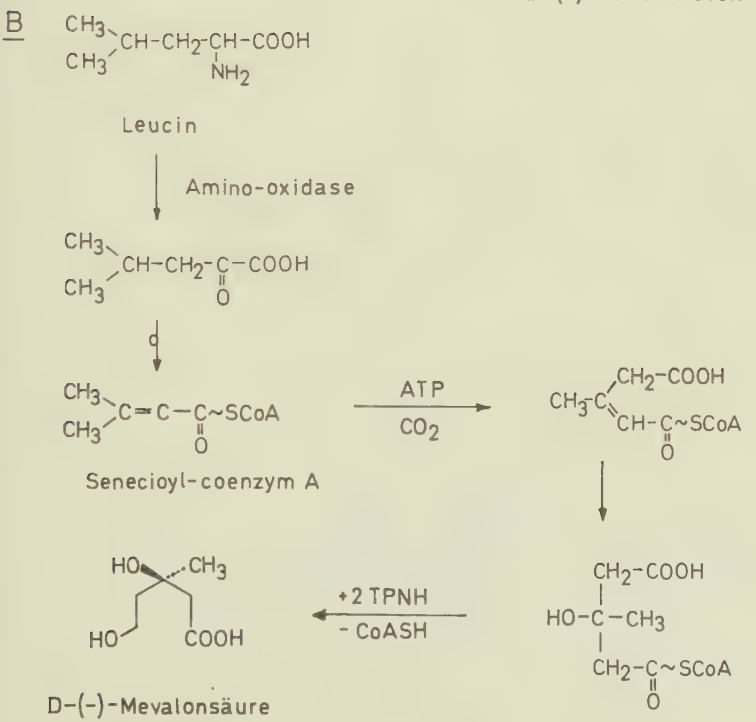
Es sind verschiedene Wege der Mevalonsäure-Synthese bekannt und postuliert worden, doch kommt dem Syntheseweg aus Acetylcoenzym A die grösste Bedeutung zu. Der von Leucin ausgehende Syntheseweg hat nur geringe Bedeutung. Der Vollständigkeit halber sei hier darauf hingewiesen. Es ist auch bekannt, dass der grösste Teil der benötigten aktivierten Essigsäure aus dem Krebszyklus stammt.

Formelschema 2

"Biosynthese von Mevalonsäure"

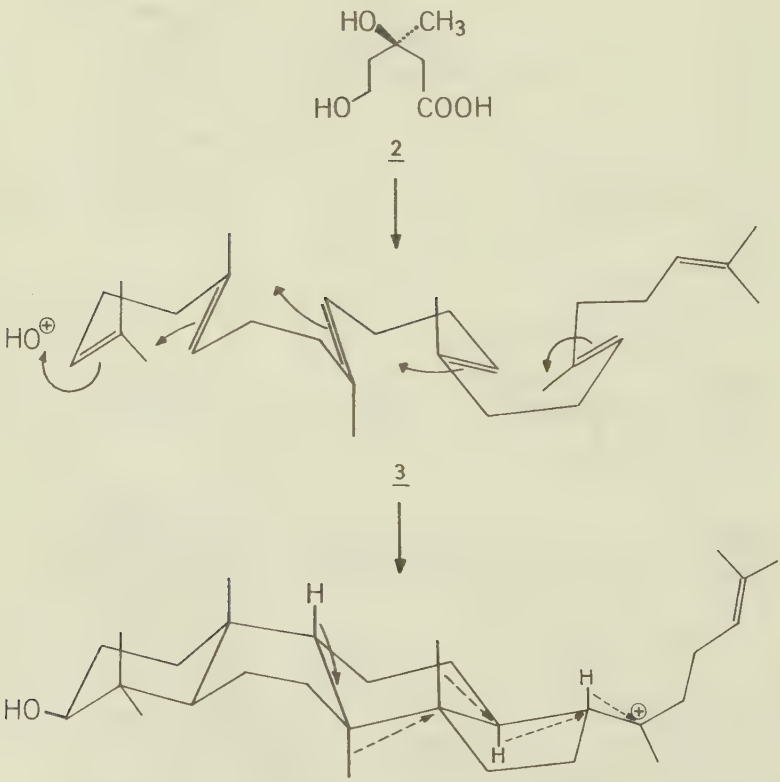



Acetoacetyl-coenzym A
+ CH3-C~SCoA
- CoASH
HO
CH3
CH2
CH2
COOH
Enz-S
O
+ 2 TPNH
- Enz-SH
HO
CH3
HO
COOH
D-(-)-Mevalonsäure
ß-Hydroxy-ß-Methyl-glutaryl-coenzym A
HO
CH3
O
O
D-(-)-Mevalolacton

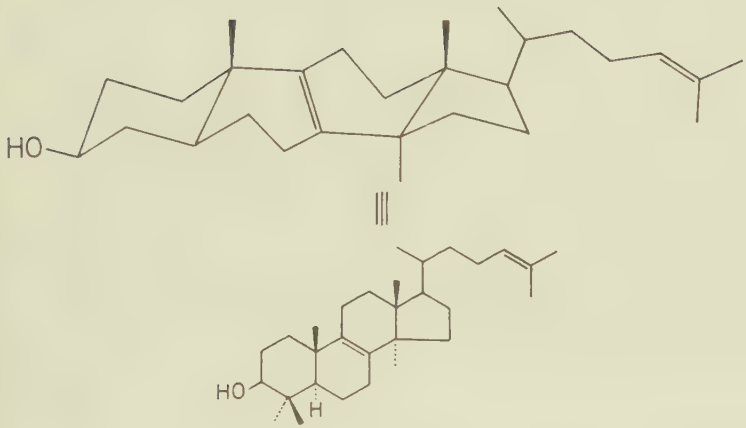

B
CH3
CH3
CH-CH2-CH-COOH
NH2
Leucin
Amino-oxidase
CH3
CH3
CH-CH2-C-COOH
O
CH3
CH3
C=C-C~SCoA
O
Senecioyl-coenzym A
ATP
CO2
CH3-C
CH2-COOH
CH-C~SCoA
O
HO
CH3
HO
COOH
D-(-)-Mevalonsäure
+2 TPNH
- CoASH
CH2-COOH
HO-C-CH3
CH2-C~SCoA
O

Unter den weiteren Reaktionsstufen nimmt das Squalen eine Schlüsselposition ein. Die Hypothese der kationischen Cyclisation, welche als eine "concerted cationic reaction" fomuliert wird, wurde zuerst im Zusammenhang mit der Umwandlung des Squalens (3) über Lanosterol (4) in Cholesterol (5), wie sie in Formelschema Nr. 3 zusammengestellt ist, postuliert (vgl.[1] [3]).

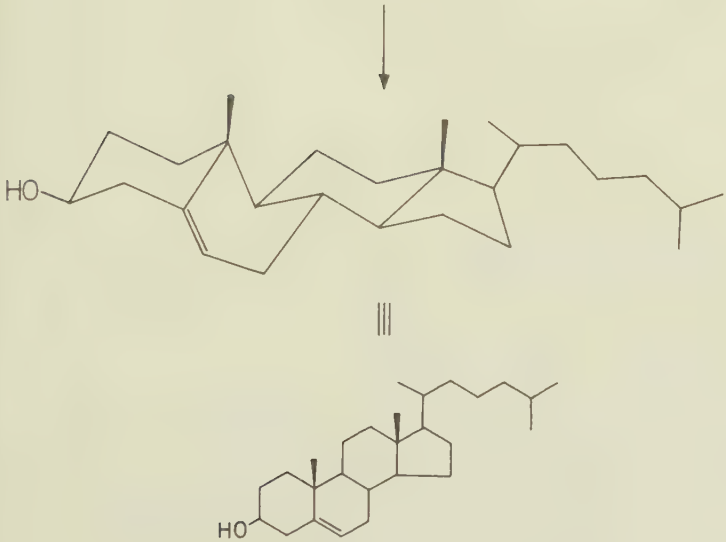
Formelschema 3
"Cyclisation von Squalen"



3

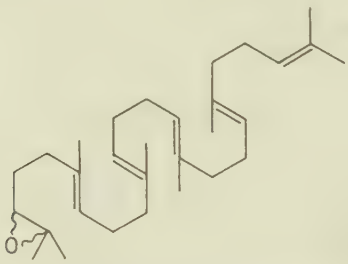


4 Lanosterol



5 Cholesterol

Diese Cyclisation wird durch das hypothetische, elektrophile Agens ($OH^{\oplus}$) eingeleitet. Der genaue Verlauf der Cyclisation von alltrans-Squalen und die daran anschliessende Methylwanderung zum Lanosterol wird weitgehend durch die besondere Konformation des in Sessel-Wanne-Sessel-Wanne-Faltung vorliegenden Squalens bestimmt. Allerdings bedarf diese Hypothese auf Grund der jüngsten Versuche von E. J. COREY et al. [7] und E. E. VAN TAMELEN et al. [8] einer Ueberprüfung. Die beiden Forschergruppen konnten zeigen, dass die Cyclisation von 2,3-Oxidosqualen (6) ausgeht. Es ist ihnen auch gelungen, eine lösliche Squalen-oxid-Cyclase in Schweineleber-Mikrosomen nachzuweisen [9].



6 2,3-Oxidosqualen

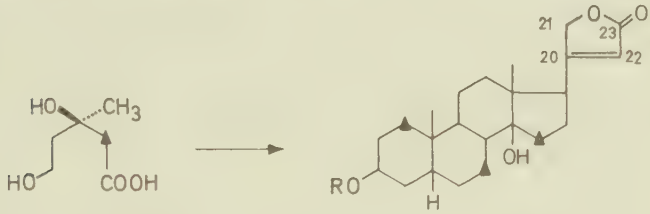
Die einzelnen Schritte der weitern Umwandlung von Lanosterol in Cholesterol sind gut begründet.

2.2. Die Biosynthese der Cardenolide

Nach eingehenden Studien der Biogenese des Cholesterols war zu vermuten, dass die Biosynthese der aus verschiedenen Digitalis-Species isolierten Cardenolide nach dem bekannten Schema Acetat-Mevalonsäure-Squalen-Lanosterol-Cholesterol verlaufen würde. RAMSTAD & BEAL [10] haben vor

einigen Jahren gezeigt, dass Digitalis lanata-Pflanzen nach Injektion von radioaktiver [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure radioaktives Lanatosid A produzieren. Die Radioaktivität dieses Glykosids war aber nur im Aglykon - dem Digitoxigenin - enthalten; Glucose und Digitoxose waren frei von Aktivität.

Wenig später haben GREGORY und LEETE [11] radioaktive [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure (2) an junge, ausgesuchte Pflanzen von Digitalis purpurea und Digitalis mertonensis verfüttert. Aus dem getrockneten Pflanzenmaterial isolierten sie radioaktives Digitoxin. Das durch Hydrolyse gewonnene Aglykon Digitoxigenin (8) erwies sich als die einzig radioaktive Komponente, während Glucose und Digitoxose, in Uebereinstimmung mit den zitierten Versuchen von RAMSTAD & BEAL, inaktiv waren.



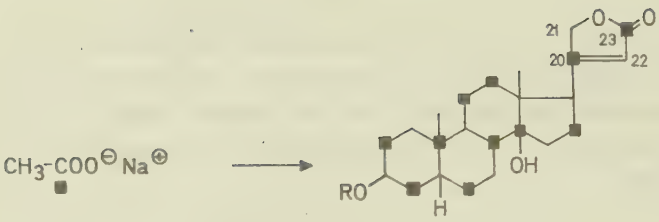
2

8 R=H
9 R=Ac

Durch Abbau konnten sie zeigen, dass der Butenolidring keine Radioaktivität besass; diese konzentrierte sich auf den restlichen Teil der Molekel.

Nach Verabreichung von [1-^{14}C]-Acetat (1) an Digitalis purpurea und Digitalis mertonensis ergab der Abbau des radioaktiven Digitoxigenins (8) die folgende Radioaktivitätsverteilung [11]:

Im Butenolidring waren C-20 und C-23 markiert.



1

8 R=H : Digitoxigenin
9 R=Ac : 3-O-Acetyl-digitoxigenin

Aus diesen etwas überraschenden Resultaten schlossen GREGORY et al. [11], dass der Butenolidring des Digitoxigenins nach Inkorporation von [2-^{14}C]-Mevalonat keine Radioaktivität enthielt. Wäre nämlich das Digitoxigenin nach dem bekannten Schema Mevalonsäure (2) - Squalen (3) - Lanosterol (4) - Cholesterol (5) (vgl. Formelschema 1) entstanden, und stammten alle 23 C-Atome des Digitoxigenins aus [2-^{14}C]-Mevalonsäure, so müssten C-1, C-7, C-15 und C-22 markiert sein, d.h. im Butenolidring wäre 1/4 der Gesamtradioaktivität zu erwarten, ebenso wäre die Aktivität gleichmässig zu je 1/4 auf die restlichen C-Atome Nr. 1, 7 und 15 verteilt.

Durch Abbau von Digitoxigenin, das nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure an Digitalis purpurea erhalten worden war, liess sich die postulierte [^{14}C]-Markierung in C-15 nachweisen [12]. Dieses C-Atom enthielt 1/3 der Gesamtaktivität. In weitern Untersuchungen zeigten LEETE et al. [13][14], dass auch C-1 und C-7 markiert waren und je 1/3 der Gesamtaktivität enthielten.

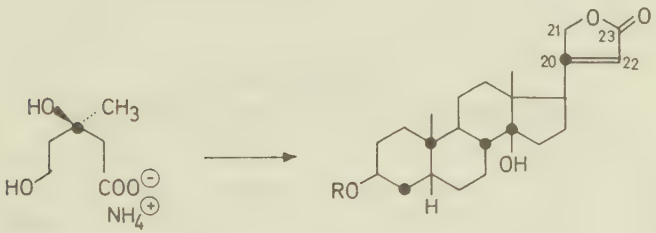
Aus all diesen Versuchen geht hervor, dass der Butenolidring von Digitoxigenin nicht aus Mevalonsäure aufgebaut wird. Ueber die biogenetische Herkunft von C-20 und C-21 sagten die Ergebnisse allerdings nichts aus.

R. TSCHESCHE [15] [16] sowie LEETE et al. [11] vermuteten daher, dass bei der Biosynthese der Cardenolide das Squalen (3)

(evtl. via Lanosterol (4) und Cholesterol (5)) bis zu einer C_{21}-Vorstufe, einem Pregnanderivat, oder einer C_{20}-Vorstufe, einem Aetiansäurederivat, intermediär abgebaut wird, worauf durch Anbau von ein oder zwei Mol Essigsäure die Resynthese zum Cardenolid erfolgt.

Das Problem der Herkunft von C-20 und C-21, das eine endgültige Entscheidung in der Frage der Zwischenstufen: Pregnanderivat oder Aetiansäurederivat, herbeiführt, wurde in den letzten 3 Jahren von verschiedenen Arbeitskreisen bearbeitet [17] [18] [19] [21].

J. von EUW & T. REICHSTEIN [19] haben die nach der Methode von TSCHESCHE & MACHLEIDT [20] synthetisierte [3-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure (2) in Form des Ammoniumsalzes nach der "Dochtmethode" an junge, ausgesuchte Pflanzen von Digitalis lanata EHRH. verabreicht und die radioaktiven Cardenolide Digitoxigenin und Gitoxigenin isoliert.



2

8 R=H : Digitoxigenin
9 R=Ac : 3-O-Acetyl-digitoxigenin

Der Abbau des radioaktiven Digitoxigenins (8) ergab, dass C-21, C-22 und C-23 inaktiv waren. Wie erwartet, war C-Atom Nr. 20 radioaktiv; es muss demnach aus Mevalonsäure stammen.

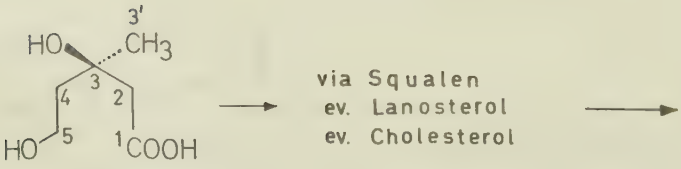
R. TSCHESCHE & G. LILIENWEISS [21] haben [21-^{14}C]-Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-on-glucosid Digitalis lanata-Pflanzen angeboten und radioaktives Digitoxigenin, Gitoxigenin und Digoxigenin isoliert.

Damit war entschieden, dass die Biosynthese der Cardenolide über ein Pregnan-derivat erfolgt und somit die erste Vermutung richtig war. Weitere Experimente von E. LEETE, H. GREGORY & E.G. GROS [13] mit [3'-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure, sowie E.G. GROS & E. LEETE [14] mit [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure erhärteten diesen Befund.

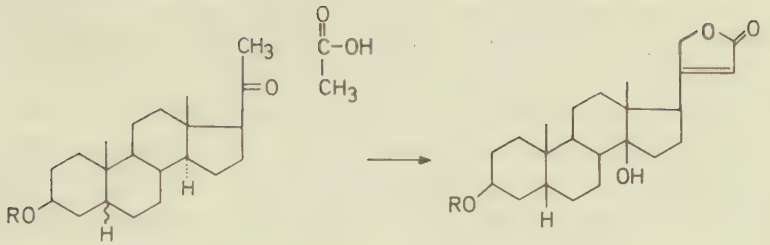
Die bisherigen Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Biosynthese der Cardenolide in der Pflanze (Gattung Digitalis) verläuft wie bei andern Steroiden über Mevalonsäure (2) und Squalen (3), das evtl. zu Lanosterol (4) zyklisiert und vermutlich über ein C_{27}-Sterol evtl. Cholesterol (5) zu einem Pregnanderivat, höchstwahrscheinlich Pregnan-20-on-derivat (7), abgebaut wird. Dieses wird durch Kondensation mit einem Mol zusätzlicher Essigsäure in das Cardenolid übergeführt (vgl. [2e]).

Formelschema 4

Biosynthese der Cardenolide in Digitalis



2



7 8 R=H

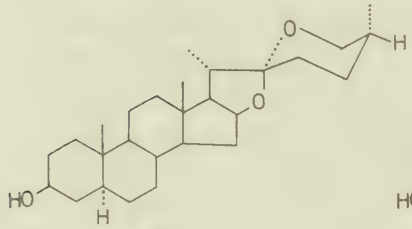
II. BIOSYNTHESE DER STEROIDSAPOGENINE (= SPIROSTANOLE)

1. Problemstellung

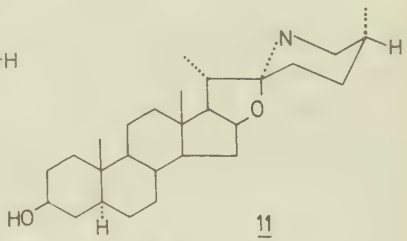
Wie wir einleitend erwähnt haben, produzieren viele Arten der Gattung Digitalis ausser den Cardenolidglykosiden auch Pregnanglykoside [2e] [18] und in grossen Mengen Spirostanol-Glykoside (= Saponine). Besonders eingehend sind die Saponine von Digitalis purpurea und Digitalis lanata untersucht worden[21] [22].

Ueber die Biosynthese der ihnen zu Grunde liegenden Sapogenine (= Spirostanole) ist noch wenig bekannt. BENNETT & HEFTMANN [24] haben gefunden, dass Keimlinge von Dioscorea spiculiflora [2-^{14}C]-Mevalonsäure in Diosgenin, Yamogenin, Gentrogenin und Correllogenin umzuwandeln vermögen. Weiter haben sie gezeigt [25], dass radioaktiv markiertes Cholesterol, welches gelöst in 80-proz. Alkohol auf Blätter von Dioscorea spiculiflora gesprüht wurde, in Diosgenin und Kryptogenin umgewandelt wird. BENNETT, LIEBER und HEFTMANN [26] haben weiter beobachtet, dass nach Verabreichung von [^{14}C]-Cholesterol an Pflanzen der Species Lycopersicon pimpinellifolium radioaktives Tomatidin (11), das Stickstoff-Ana-

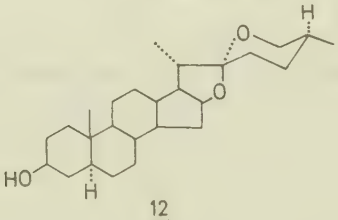
logon von Neotigogenin (10), isoliert wird. Erst kürzlich haben sie gefunden, dass das verabreichte [^{14}C]-Cholesterol auch als biogenetischer Vorläufer von Neotigogenin, dem



10



11



12

25β-Isomeren von Tigogenin, und Δ^{16}-5α-Pregnen-3-ol-20-on in Lycopersicon pimpinellifolium dient [27]. Die Umwandlung findet dabei vorwiegend in den Blättern und Blüten der behandelten Pflanzen von Dioscorea und Lycopersicon statt.

TSCHESCHE und HULPKE [28] ihrerseits haben beobachtet, dass [4-^{14}C]-Cholesterolglucosid von Digitalis lanata-Pflanzen in Tigogenin und Gitogenin umgewandelt wird. Aus diesen Versuchen haben die Autoren geschlossen, dass Cholesterol eine Zwischenstufe in der Sapogeninbiosynthese ist [26] [29].

Sowohl Cholesterol wie auch die Spirostanole besitzen das gleiche Gerüst aus 27 C-Atomen, während die gleichzeitig in Digitalis vorkommenden Cardenolide nur 23 C-Atome enthalten. Es steht fest, dass bei der Bildung der digitaloiden Lactone zuerst ein Abbau zu einem 21 C-Atome enthaltenden Steroid (Pregnanderivat) stattfindet, an das 1 Mol

Acetat angefügt wird.

Da bei den Sapogeninen die Verteilung der Radioaktivität der eingebauten biogenetischen Vorläufer (= Precursors), insbesondere diejenige der Mevalonsäure, nicht bestimmt worden ist, kann man einen analogen Syntheseweg, d.h. Abbau und Resynthese, bei der Bildung des Spiroketalsystems a priori zumindest in Digitalis nicht ausschliessen.

Um diese Frage abzuklären und um weitere Einzelheiten über die Stereochemie der Biosynthese der Spirostanole zu erfahren, wurden die in den folgenden Kapiteln der vorliegenden Dissertation beschriebenen Versuche unternommen.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst [3-^{14}C]-D,L-Mevalonat jungen Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen verabreicht und die radioaktiven Spirostanole Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin isoliert. Mit Hilfe eines gezielten chemischen Abbaus gelang es, in Tigogenin die Verteilung der Radioaktivität in der Molekel zu bestimmen. Da sich bei diesen Versuchen herausstellte, dass die Mevalonsäure am Aufbau der Spiroketalgruppierung beteiligt ist, stellte sich als weiteres Problem die Bestimmung der Herkunft der C-Atome Nr. 26 und Nr. 27. Die Bedeutung dieser Frage und die Konsequenzen der Antwort werden weiter unten (siehe Seite 49 ff) ausführlicher diskutiert. Zur Lösung des zweiten Problems wurde [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton an Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen verabreicht und das erhaltene, radioaktive Tigogenin wieder abgebaut.

2. Isolierung der radioaktiven Cardenolide und Spirostanole aus Digitalis lanata EHRH.

2.1. Fütterungsversuche mit [3-^{14}C]-D,L-Ammonium-mevalonat

Ausgesuchten, kultivierten Pflanzen von Digitalis lanata EHRH [1] wurde nach der Dochtmethode eine Lösung des Ammoniumsalzes von [3-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure in Wasser, die nach der Methode TSCHESCHE & MACHLEIDT [20] bereitet worden war, verabreicht. Nach einer Zeitspanne von 21 Tagen wurden die Blattrosetten der behandelten Pflanzen über den Wurzeln abgeschnitten. Die oberirdischen Teile (Stengel und Blätter) wurden sorgfältig getrocknet und gepulvert. Nach Weichen mit Wasser (= Fermentierung), $Pb(OH)_2$-Reinigung [30] und üblicher Aufarbeitung erhielten VON EUW & REICHSTEIN [19] [31] die in Tabelle 2 zusammengefassten Ausbeuten an Rohextrakten.

---

1) Es dienten hierzu kultivierte Pflanzen eines ausgesuchten Stammes (A-Pflanzen), die vorwiegend Digitoxigeninglykoside und fast keine Digoxigeninglykoside produzieren. Die Pflanzen wurden uns von der Firma SANDOZ A.G., Basel, in der Versuchsgärtnerei der Firma im Klushof, Aesch, BL, zur Verfügung gestellt. Wir möchten der Firma SANDOZ A.G., sowie den Herren Dres. J. RUTSCHMANN und E. ANGLIKER hier für ihre Hilfe bestens danken, ebenso Herrn P. ACHERMANN für die gärtnerische Betreuung der Pflanzen.

Tabelle 2

Ausbeute an Rohextrakten aus 85 g getrockneten Blättern von Digitalis lanata EHRH. nach Verabreichung von total 0,256 mC [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat a).

Auszug	Menge in mg	Radioaktivität in dpm pro mg	Radioaktivität in dpm total	Absolute Einbaurate % b)	Korrig. abs. Einbaurate % c)
Petroläther (Fette, Sterole)	860	6540	5'624000	0,9897	1,9794
Chloroform (Cardenolide)	3500	8210	28'735000	5,0561	10,1122
Chloroform-Alkohol (2:1)	810	9630	7'800000	1,3725	2,7450
Chloroform-Alkohol (3:2)	1270	12000	15'240000	2,6815	5,3630
Chloroform-Alkohol-Extrakte (Saponine)	2080		23'040000	4,0540	8,1080

a) 1 C = $3{,}7 \cdot 10^{10}$ dps)
= $222 \cdot 10^{10}$ dpm) 0,256 mC = 568'320'000 dpm
1mC = $222 \cdot 10^{7}$ dpm)

b) Absolute Einbaurate = $\frac{\text{Gesamtradioaktivität im Produkt x 100}}{\text{Gesamtradioaktivität im Precursor}}$ (%)

c) Es ist bekannt, dass nach Verabreichung von D,L-Mevalonsäure von der Pflanze nur die D-Komponente verarbeitet wird.

Korr. abs. Einbaurate = $\frac{\text{Gesamtradioaktivität im Produkt x 100}}{\text{Gesamtradioaktivität im Precursor bezogen auf D-Mevalonat}}$ (%)

Nach milder, saurer Hydrolyse [32] des Chloroform-Auszuges und Chromatographie an Aluminiumoxid (Al_2O_3) erhielten sie radioaktives Digitoxigenin und Gitoxigenin. Das Digitoxigenin-Präparat diente VON EUW & REICHSTEIN für die Abbauversuche zur Klärung der Cardenolidbiosynthese [19].

Die vor allem die Spirostanolglykoside enthaltenden, stärker polareren Chloroform-Alkohol-Auszüge wurden einer energischen, sauren Hydrolyse mit HCl-Eisessig-Wasser (10:35:55) nach Kiliani [33] und einer alkalischen Nachhydrolyse mit methanolischer KOH unterworfen. Das dabei erhaltene, rohe Sapogeningemisch wurde zweimal an Kieselgel (SiO_2) chromatographiert. Die isolierten Aglykone Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin wurden bis zum konstanten Schmelzpunkt und zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert. Die Identifizierung der nach Dünnschichtchromatographie einheitlichen Sapogenine erfolgte durch direkten Vergleich mit authentischem Material [2].

Die Ausbeuten und Resultate der Radioaktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

---

2) Für die Isolierung und Ueberlassung des radioaktiven Sapogeninmaterials danke ich den Herren Dres. J. VON EUW und A. LARDON bestens.

Tabelle 3

[3-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure-Tracer-Versuch

Isolierung der Cardenolide und Sapogenine nach Verabreichung von total 0,256 mC [3-^{14}C]-D,L-Ammonium-Mevalonat (= 568,32·10^6 dpm).

	Mol-Gew.	Menge Rein mg	Menge inkl. Mutterlauge mg	Radioaktivität in dpm					Abs. Einbaurate %	Korrig. abs. Einbaurate %
				Reinprodukt			inkl. Mutterlauge			
				pro mg	total	pro mMol	total	pro mMol		
1. Cardenolide										
Digitoxigenin	374	115	245	9'500	1'092'500	3'560'000	2'327'500	3'560'000	0,4095	0,8190
Gitoxigenin	390	27	100	8'900	240'300	3'480'000	890'000	3'480'000	0,1566	0,3132
2. Sapogenine										
Tigogenin	416	130	152	31'500	4'095'000	13,104·10^6	4'788'000	13,104·10^6	0,8424	1,6848
Gitogenin	432	54,2	58,7	39'400	4'135'480	17,021·10^6	2'312'780	17,021·10^6	0,4069	0,8138
Digitogenin	448	13,8	33,8	18'200	251'160	8,154·10^6	615'160	8,154·10^6	0,1082	0,2164

2.2. Fütterungsversuche mit [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton

Es wurde eine wässrige Lösung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäurelacton an ausgesuchte, kultivierte Pflanzen von Digitalis lanata EHRH. (Stamm A) verabreicht [3]. Die Aufnahme des radioaktiven Precursors erfolgte nach der bewährten "Dochtmethode", wonach ein hygrophiler Baumwollfaden direkt oberhalb des Wurzelhalses in das pflanzliche Gefässsystem eingeführt wird. Nach einer Wachstumsperiode von 15 Tagen wurden die Pflanzen geerntet, die Blattrosetten abgeschnitten und das gesamte Pflanzenmaterial (oberirdische Teile) sofort aufgearbeitet [4]. Wir erhielten nach üblichem Aufarbeiten die in der folgenden Tabelle 4 zusammengestellten Ausbeuten an Rohextrakten. Radioaktivitätsmessungen dieser Extrakte ergaben, dass auch [2-^{14}C]-D,L-Mevalonsäurelacton mehr oder weniger aufgenommen und von der Pflanze verarbeitet wurde.

Wenn wir die Zahlenwerte der Einbauraten der [3-^{14}C]- und [2-^{14}C]-D,L-Mevalonat-Versuche miteinander vergleichen, stellen wir fest, dass [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat 1 - 20 mal besser inkorporiert wurde als [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton. Dieser etwas überraschende Befund lässt sich durch die grössere Wasserlöslichkeit des [3-^{14}C]-Ammoniummevalonats erklären, welche der Pflanze eine bessere Resorption ermöglicht.

---

3) Das Pflanzenmaterial wurde uns wiederum von der Firma SANDOZ A.G., Basel, in der Versuchsgärtnerei Klushof, Aesch, BL, zur Verfügung gestellt.

4) Die Inkubationsversuche und die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials wurden von den Herren Dres. A. LARDON und J. VON EUW durchgeführt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Tabelle 4

Ausbeute an Rohextrakten nach Verabreichung von total 1 mC [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton an 15 Pflanzen von Digitalis lanata EHRH.

Auszug	Menge in mg	Radioaktivität in dpm pro mg	pro total	Absolute Einbaurate %	Korrig. abs. Einbaurate %
Aether	1460	2720	3'971'200	0,1788	0,3576
Chloroform (Cardenolide)	755	15370	11'604'350	0,5225	1,0450
Chloroform-Alkohol (9:1)	330	18900	6'237'000	0,2810	0,5620
Chloroform-Alkohol (3:2) (Saponine)	950	46500	44'175'000	1,9910	3,9820
1 mC = $222 \cdot 10^7$ dpm					

Im übrigen ist bekannt, dass nach Verabreichung von D,L-Mevalonsäure von der Pflanze nur das Enantiomere mit der D-Konfiguration für die Biogenese verarbeitet wird. In den Tabellen trägt die Kolonne "Korrig. abs. Einbaurate" diesem Umstand Rechnung.

Der die Cardenolide enthaltende Chloroform-Auszug wurde von T. REICHSTEIN und Mitarbeitern übernommen. Sie werden über ihre Versuche gesondert berichten.

Der die Saponine enthaltende Chloroform-Alkohol-(3:2)-Extrakt wurde von uns weiter verarbeitet. Energische, saure

Hydrolyse mit HCl-Eisessig-Wasser (10:35:55) nach KILIANI [33] und Nachhydrolyse mit methanolischer KOH zur Entfernung der Zersetzungsprodukte des Chlorophylls lieferte wiederum die Sapogenine als Rohgemisch. Nach wiederholter Chromatographie an Kieselgel (SiO_2) isolierten wir die Sapogenine Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin. Sie wurden erst nach weiterer Chromatographie nach der Methodik von DUNCAN [34] rein erhalten. Bei den isolierten kristallinen Sapogeninen handelte es sich um Präparate, die bis zum konstanten Schmelzpunkt umkristallisiert worden waren, und im Dünnschichtchromatogramm einen scharf begrenzten Fleck ergaben. Die Identifizierung der einzelnen Sapogenine geschah durch direkten Vergleich mit authentischem, inaktivem Vergleichsmaterial [5].

Ueber die Resultate der Radioaktivitätsmessungen der isolierten Sapogenine orientiert Tabelle 5 .

---

5) Für die Ueberlassung des authentischen Sapogeninvergleichsmaterials danken wir den Herren Dres. A. LARDON und J. VON EUW bestens.

Tabelle 5

$[2\text{-}^{14}C]$-D,L-Mevalonsäure-Tracer-Versuch

Isolierung der Sapogenine nach Verabreichung von total 1 mC $[2\text{-}^{14}C]$-D,L-Mevalonsäurelacton (= $2'220 \cdot 10^6$ dpm)

	Molekulargew.	Menge inkl. Mutterlauge	Radioaktivität in dpm			Abs. Einbaurate %	Korrig. abs. Einbaurate %
			pro mg	total	pro mMol		
Sapogenine							
Tigogenin	416	27,9 mg	36'200	1'009'980	15'059'200	0,04549	0,09098
Gitogenin	432	7,0 mg	75'100	525'700	32'443'200	0,02368	0,04736
Digitogenin	448	27,0 mg	36'200	977'400	16'217'600	0,04403	0,08806

1 mC = $222 \cdot 10^7$ dpm

3. Vorversuche zum Abbau von Tigogenin

Abbau, Charakterisierung und Identifizierung radioaktiver Materialien setzen eine gründliche Kenntnis der einzelnen Reaktionsstufen voraus. Bevor ein Abbau mit radioaktivem Material in Angriff genommen werden kann, müssen die Abbaumethoden mit inaktivem Material für die geringen Substanzmengen, die bei den Versuchen mit radioaktiven Präparaten zu erwarten sind, ausgearbeitet werden, um die Ausbeuten und die Reinheit der Produkte sowie die Bilanz der Radioaktivitäten zu garantieren.

3.1. Beschaffung des inaktiven Materials

Sorgfältig getrocknetes Pflanzenmaterial von Digitalis lanata EHRH.[6] wurde in Wasser geweicht (= fermentiert) und anschliessend wiederholt mit Wasser-Alkohol-Gemischen ausgezogen. Nach Behandlung mit $Pb(OH)_2$ zur Abtrennung der Begleitstoffe (Gerbstoffe und Tannine) und schonendem Eindampfen im Vakuum (vgl. experimenteller Teil), wurde die wässerige Extraktlösung mit Petroläther, Chloroform und Chloroform-Alkohol-(3:2)-Gemischen ausgeschüttelt. Die Chloroform-Auszüge enthielten die Cardenolid-Glykoside, wogegen in den Chloroform-Alkohol-Auszügen die Spirostanol-Glykoside (= Saponine) enthalten waren. Die Chloroform-Alkohol-Auszüge wurden vereinigt und energisch mit HCl-Eisessig-Wasser (10: 35:55) nach KILIANI [33] hydrolysiert. Das dabei resultierende rohe Sapogeningemisch lieferte nach wiederholter Chromato-

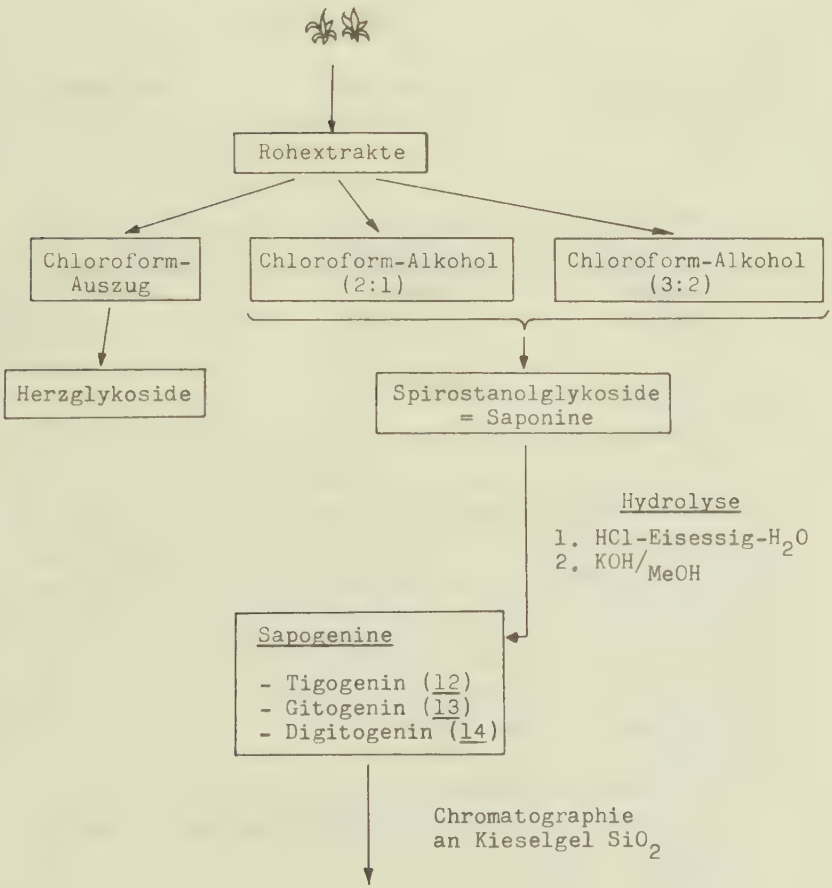
---

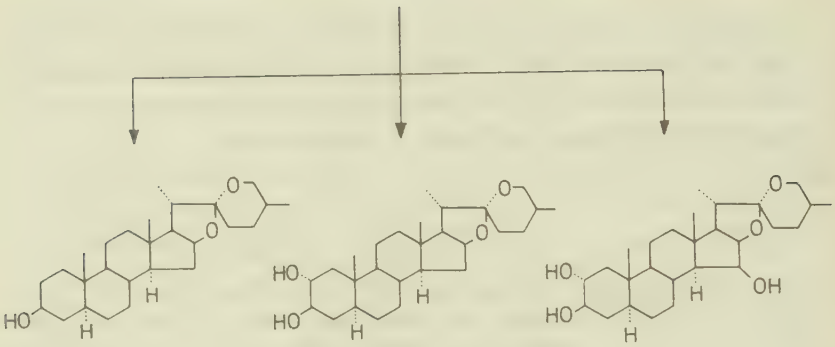
6) Pflanzenmaterial: Digitalis lanata EHRH. Ernte 1961.
Das Material wurde von der Firma SANDOZ A.G., Basel, zur Verfügung gestellt.

graphie an Kieselgel (SiO_2) nach der Durchlaufmethode [35] und der Methodik nach DUNCAN [34] die Sapogenine Tigogenin (12), Gitogenin (13) und Digitogenin (14). Der Trennungsgang ist im folgenden Schema 5 dargestellt.

Schema 5

Zusammenstellung der Isolierung der Cardenolide und Sapogenine aus Digitalis lanata EHRH.





12 13 14

Tigogenin	Gitogenin	Digitogenin
$C_{27}H_{44}O_3$ (416)	$C_{27}H_{44}O_4$ (432)	$C_{27}H_{44}O_4$ (448)
$[\alpha]_D^{22}$ - 67° ± 2°	$[\alpha]_D^{22}$ -75° ± 2°	$[\alpha]_D^{22}$ - 80° ± 2°
Smp.: 204°	Smp.: 272°	Smp.: 296°
Charakterisierung	Charakterisierung	Charakterisierung
- 3β (OH)	- 2α,3β (OH)	- 2α,3β,15β (OH)
- 5α,14α (H)	-5α,14α (H)	- 5α,14α (H)

Die Identifizierung der Sapogenine (= Spirostanole) erfolgte durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Vergleich der Laufstrecken in den Dünnschichtchromatogrammen (Rf-Werte) und der IR.-Spektren mit authentischem Sapogeninvergleichsmaterial [7]. Die IR.-Spektren sind ein besonders geeignetes, diagnostisches Hilfsmittel für die Sapogenine, denn die Spiroketal-Seitenkette ruft mehrere kräftige Banden zwischen 1380 cm^{-1} und 865 cm^{-1} hervor (vgl. [36]).

---

7) Wir danken den Herren Dres. A. LARDON und J. VON EUW sowie Prof. T. REICHSTEIN für die Ueberlassung der Vergleichsproben.

Die starke Bande bei 3520 cm^{-1} sowie die breite Bande um 3400-3200 cm^{-1} sind der Hydroxylfunktion in C-3 (3β-OH) (intermolekulare Assoziation) zuzuordnen (vgl. Fig. 1).

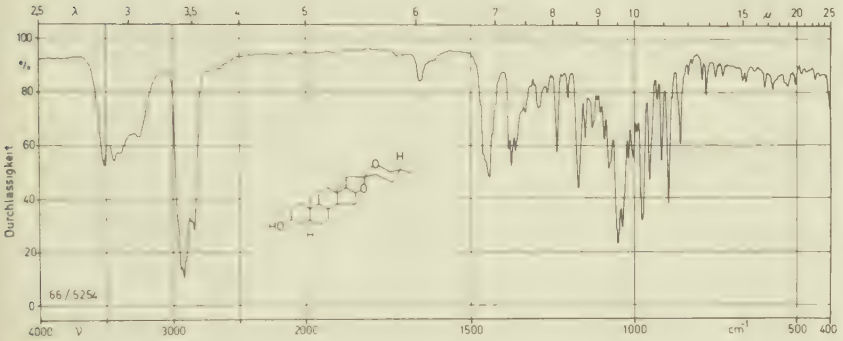
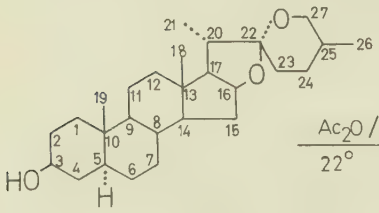


Fig. 1 IR.-Spektrum von Tigogenin (12) in KBr [8]

8) Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER).

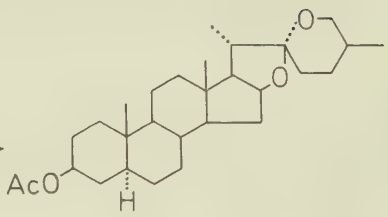
9) Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 (60 MHz) im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER). Chemische Verschiebung in ppm-Werten, mit $Si(CH_3)_4$. (TMS) als internem Standard.

Formelschema 6: Abbau von Tigogenin



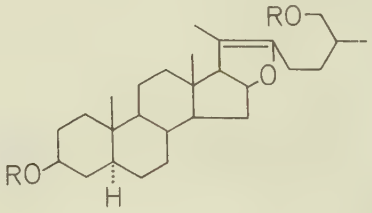
12 Tigogenin

Ac_2O / Py
22°



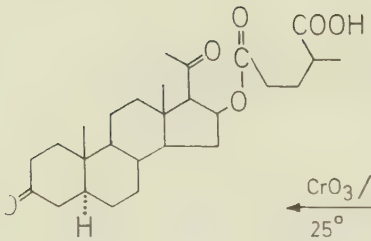
15

1) n-Caprylsäure / Ac_2O
250° / 3 Std.
2) KOH / CH_3OH



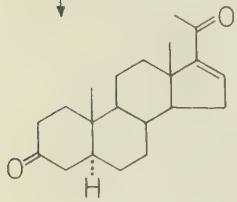
16 R = Ac
R = H

CrO_3 / AcOH
25°



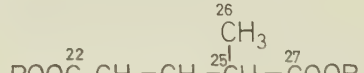
17

NaOH / H_2O / CH_3OH
80°



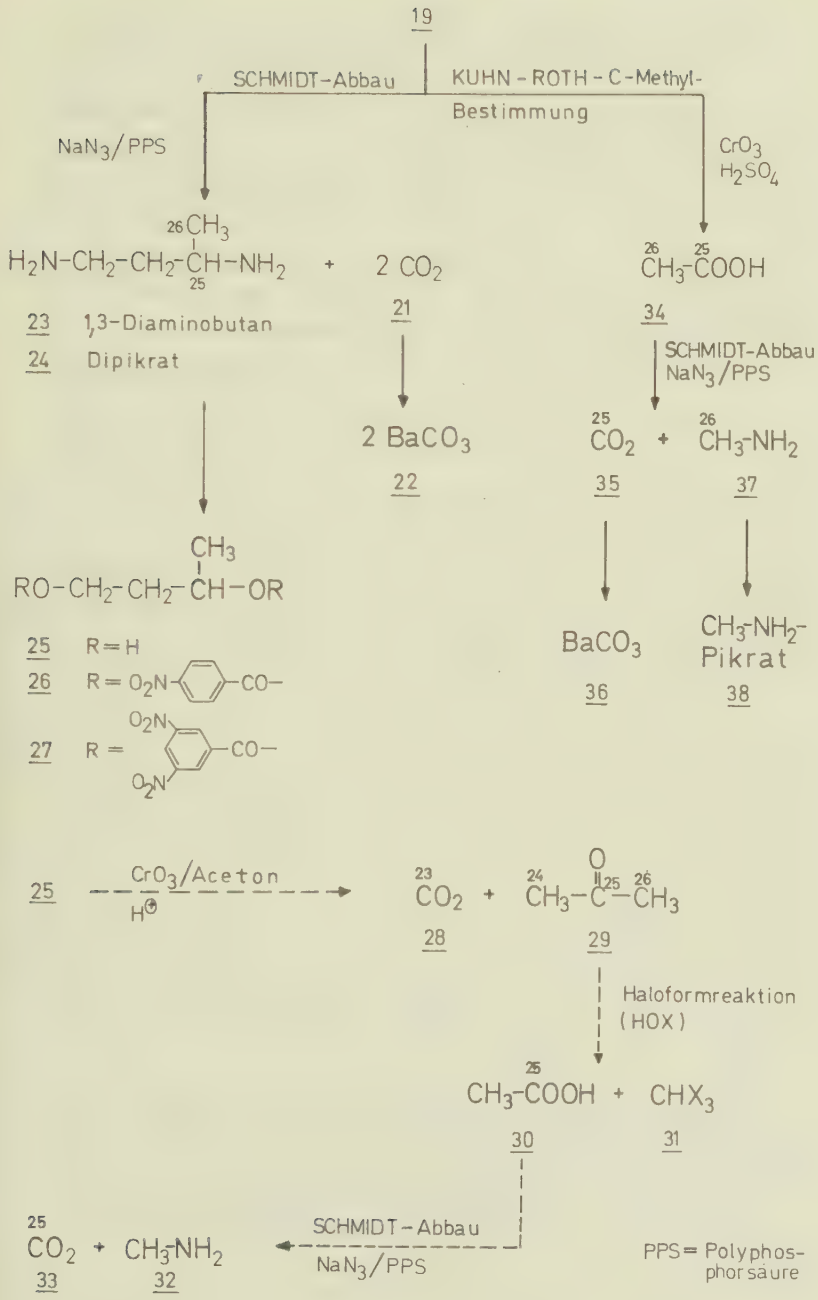
18

+



19 R = H
20 R = Br-C6H4-C(=O)-CH2-

Es bedeutet : Ac = CH_3CO-


19
SCHMIDT-Abbau
KUHN - ROTH - C-Methyl-Bestimmung
NaN3/PPS
CrO3 H2SO4
H2N-CH2-CH2-CH(26CH3)-NH2 (25)
23 1,3-Diaminobutan
24 Dipikrat
+ 2 CO2
21
2 BaCO3
22
26CH3-25COOH
34
SCHMIDT-Abbau NaN3/PPS
25CO2 + 26CH3-NH2
35 37
BaCO3
36
CH3-NH2- Pikrat
38
RO-CH2-CH2-CH(CH3)-OR
25 R=H
26 R = O2N-C6H3-CO-
27 R = (O2N)2-C6H3-CO-
25 --CrO3/Aceton, H⊕--> 23CO2 + 24CH3-C(=O)-25-26CH3
28 29
Haloformreaktion (HOX)
CH3-25COOH + CHX3
30 31
SCHMIDT-Abbau NaN3/PPS
25CO2 + CH3-NH2
33 32
PPS = Polyphosphorsäure

3.2. Abbau von Tigogenin zur Erfassung der C-Atome Nr. 22 - 27

Tigogenin (12), welches wie in Kap. 3.1. beschrieben aus Digitalis lanata EHRH. isoliert werden konnte, wurde mit Acetanhydrid-Pyridin (22°) in 3-O-Acetyltigogenin (15) überführt. Im IR.-Spektrum stellt man sofort das Fehlen der Hydroxylbanden um 3500 - 3600 cm^{-1} fest; die Acetat-Ester-Bande erscheint dabei bei 1735 und 1245 cm^{-1}; alle übrigen von der Spiroketalgruppierung herrührenden Banden zwischen 1370 und 870 cm^{-1} sind, wie erwartet, erhalten geblieben.

Durch Erhitzen mit n-Caprylsäure unter Stickstoff während 3 Std. unter Rückfluss liess sich 3-O-Acetyltigogenin (15) in 83 % Ausbeute zu Pseudotigogenin (16) isomerisieren [37]. Dieses Verfahren der Isomerisierung erwies sich gegenüber allen andern publizierten Methoden, wie die Bombenrohrreaktionen mit Acetanhydrid und Isomerisierungsversuche mit Lewis-Säuren als Katalysatoren etc., für die Umsetzung von kleinen und kleinsten Substanzmengen weitaus am besten.

Im IR.-Spektrum von Pseudotigogenin (16) erkennt man ganz deutlich das Fehlen der typischen Spiroketalbanden. Die stärksten Banden neben der C-O-Streckschwingung bei 3600 cm^{-1} erscheinen bei 1020-1045 cm^{-1}, andere Banden im Fingerprintgebiet sind eher schwach. Die relativ schwachen Banden um 1695 und 1605 cm^{-1} sind für die Vinyläthergruppierung verantwortlich. Auch die andern Banden des IR.-Spektrums von 16 sprechen, verglichen mit Spektrendaten aus der Literatur [36], eindeutig für das Vorliegen von Pseudotigogenin (16).

Oxidation von 16 mit CrO_3 in Eisessig bei 22-25° lieferte das Ketoesterderivat 17. Nach Behandeln mit NaOH in wässerigem Methanol wurde 17 in Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion

(= Allopregnendion) (18) und α-Methylglutarsäure (19) übergeführt; ersteres enthält die C-Atome Nr. 1 - 21 der ursprünglichen Sapogeninmolekel, letzteres die C-Atome Nr. 22 - 27. Die beiden Spaltprodukte 18 und 19 erwiesen sich nach allen Kriterien der chemischen Untersuchungen als identisch mit authentischem Material.

Das IR.-Spektrum von α-Methylglutarsäure zeigt bei 3000 cm^{-1} die charakteristische breite HO-Streckschwingungsbande und bei 928 cm^{-1} die breite HO-Deformationsschwingungsbande der Carboxylgruppen der α-Methylglutarsäure. Neben andern starken Banden im Fingerprintgebiet erkennt man bei 1690 cm^{-1} die starke C=O-Streckschwingungsbande.

Im NMR.-Spektrum von 19 (vgl. Fig. 2) erkennt man deutlich die beiden sauren Protonen der Carboxylgruppen, welche als Singlett bei 9,59 ppm, dann die als Multiplett im Bereich von 1,60 ppm bis 2,70 ppm hervortretenden CH_2-Protonen und endlich die als Dublett bei 1,16 ppm und 1,30 ppm erscheinenden Signale der sekundären Methylgruppe (J ≃ 7 cps).

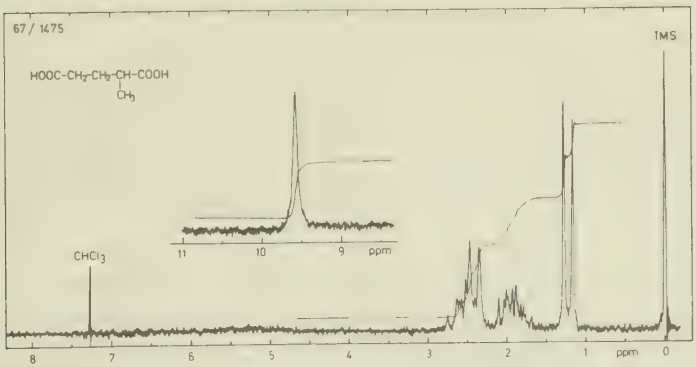


Fig. 2a NMR.-Spektrum von α-Methylglutarsäure (19) in Deuterochloroform [9]

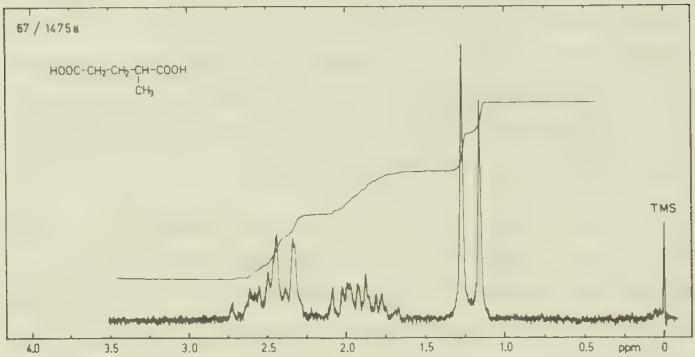


Fig. 2b NMR.-Spektrum von α-Methylglutarsäure (19) in Deuterochloroform [9]

Als krist. Derivat für die spätere Radioaktivitätsbestimmung von α-Methylglutarsäure (19) erwies sich der Bis-[para-Bromphenacylester] 20 als geeignet. Die im IR.-Spektrum dieses Derivats (vgl. Fig. 3) bei 1735 und 1155 cm^{-1} auftretenden starken Banden werden durch die Streckschwingungen der C=O- und C-O-C-Estergruppierung hervorgerufen. Bei 1690 cm^{-1} erscheint die nach höherer Frequenz verschobene C=O-Streckschwingung der Phenacylgruppierung. Die Banden bei 1580, 1480 und 1415 cm^{-1} sind den kombinierten C-C-Streckschwingungen des aromatischen Systems zuzuschreiben. Weiter erkennt man bei 805 cm^{-1} eine starke, markante Bande, die der para-Disubstitution des Aromaten zugeordnet werden muss.

Die weiteren Abbaureaktionen waren auf die spezifische Erfassung der einzelnen C-Atome der α-Methylglutarsäure gerichtet, die den C-Atomen Nr. 22 - 27 des Tigogenins entsprechen. Der Einfachheit halber werden die C-Atome der α-Methylglutarsäure mit den Nummern des ursprünglichen Tigogenins bezeichnet.

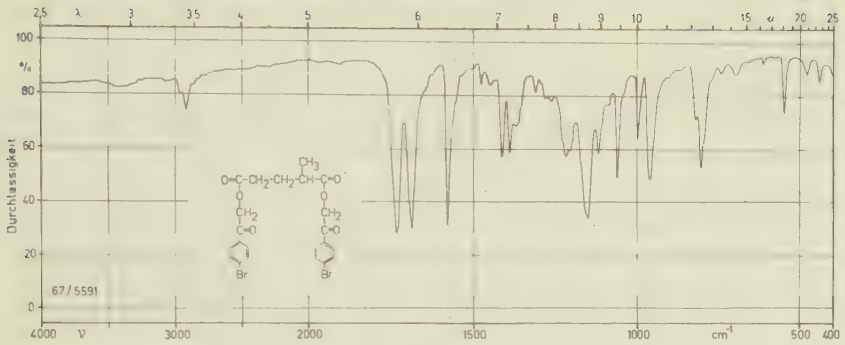


Fig. 3 IR.-Spektrum von α-Methylglutarsäure-Bis[p-Brom-phenacylester] (20) in KBr [8)]

Ein,nach der von J.J. BRITT & D. ARIGONI [38] ausgearbeiteten Methode,modifizierter SCHMIDT-Abbau (NaN_3/Polyphosphorsäure = PPS) [10)] lieferte uns C-22 und C-27 als CO_2 (21) resp. $BaCC_3$ (22) sowie 1,3-Diaminobutan (23), das zur Charakterisierung in das Dipikrat (24) übergeführt wurde.

1,3-Diaminobutan (23) wurde durch oxidative Desaminierung [40] mit $NaNO_2$ in wässerigem Eisessig behandelt. Das zu erwartende Butan-1,3-diol (25) bildete sich in nur 1 % Ausbeute. Es wurde durch Ueberführung in das Bis-[para-Nitro-Benzoat] (26) und in das Bis-[3,5-Dinitro-Benzoat] (27) charakterisiert. Das IR.-Spektrum (KBr) von 26 (vgl. Fig. 4) zeigt bei 1715 und 1270 cm^{-1} charakteristische Esterbanden (C=O-Streckschwingung und asymmetrische C-O-C-Streckschwingung), ferner bei 1600, 1515 cm^{-1} die C-C-Streckschwingungs-

---

10) SCHMIDT-Abbau: Beim SCHMIDT-Abbau nach der modifizierten Methode wird anstelle von H_2SO_4 Polyphosphorsäure verwendet. Wir verdanken diese Anregung einer privaten Mitteilung von Herrn Prof. D. ARIGONI, Zürich.(Darstellung v. PPS:vgl.[39]).

bande des aromatischen Systems. Die starke Bande von 710 cm^{-1} deutet auf die p-Substitution hin, während die Banden bei 1515 und 1340 cm^{-1} der Aryl-NO_2-Gruppierung zuzuordnen sind.

Das IR.-Spektrum (KBr) von Butan-1,3-diol-Bis[3,5-Dinitro-benzoat] (27) (vgl. Fig. 5) ist sehr ähnlich. Die starke Bande bei 1715 und 1265 cm^{-1} wird der Aryl-Ester-gruppierung zugeordnet; sodann erkennt man bei 1620, 1590, 1530 und 1450 cm^{-1} die Streckschwingungsbanden des aromatischen Systems, bei 1335 und 1525 cm^{-1} die Aryl-NO_2-Streckschwingungsbanden und endlich die starke Doppelbande bei 710 und 720 cm^{-1} des m-trisubstituierten Arylsystems.

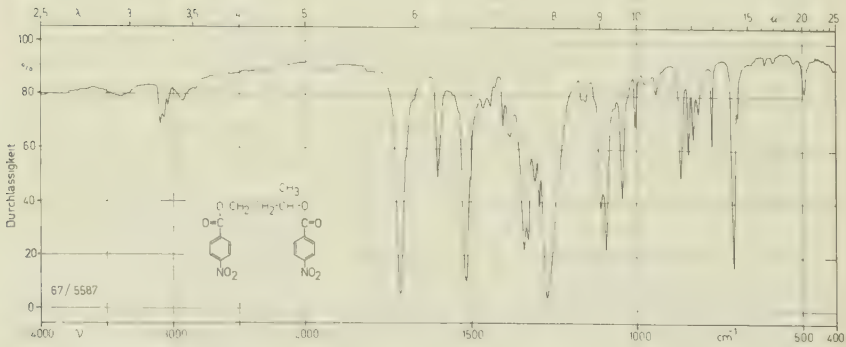


Fig. 4 IR.-Spektrum von Butan-1,3-diol-Bis-[para-NO_2-Benzoat] (26) in KBr [6]

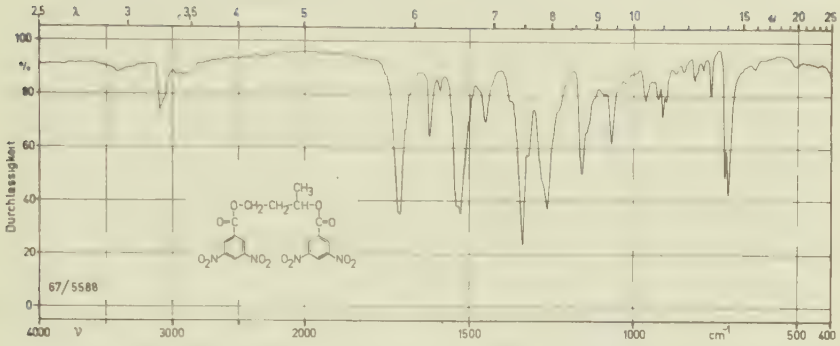
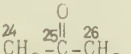


Fig. 5 IR.-Spektrum von Butan-1,3-diol-Bis[3,5-Dinitro-Benzoat] (27) in KBr [8]

Die schlechte Ausbeute an Butan-1,3-diol bei der oxidativen Desaminierung von 1,3-Diaminobutan kann damit erklärt werden, dass das intermediär gebildete Carboniumion Anstoss zu den verschiedensten Umlagerungsreaktionen und Folgereaktionen gibt.

Grundsätzlich wollten wir das Diol 25 mit CrO_3/H_2SO_4-Aceton nach JONES [41] zur Ketosäure oxidieren. Dabei ist zu beachten, dass die intermediär gebildete Acetessigsäure in saurem Milieu zum Aceton (29) decarboxyliert wird. Eine anschliessende Haloformreaktion von 29 hätte uns wieder unselektiv die Essigsäuren (30) $^{24}CH_3{}^{25}COOH$ und $^{26}CH_3{}^{25}COOH$ neben den Haloformverbindungen (31) geliefert.



Durch den SCHMIDT-Abbau [38] von CH_3COOH (30) liesse sich das C-Atom Nr. 25 selektiv als CO_2 resp. $BaCO_3$ (33) erfassen, hingegen könnte über die wichtigen C-Atome

Nr. 24 und Nr. 26 nichts Bestimmtes ausgesagt werden, da die entsprechenden Reaktionen nicht selektiv verlaufen.

Wir haben deshalb die α-Methylglutarsäure (19) selbst einer Kuhn-ROTH-Oxidation [42] unterzogen. Theoretisch wird bei dieser Reaktion 1 Mol Essigsäure erwartet. Die Theorie wird denn auch in der Praxis (vgl. experimenteller Teil) bestätigt. Die Charakterisierung und Identifizierung der Abbau-Essigsäure (34) erfolgte gaschromatographisch (Trennung an einer Neopentylglykolsuccinatsäule) [43]. Die gaschromatographischen Versuche haben im weitern ergeben, dass bei KUHN-ROTH-Oxidation sich ausschliesslich Essigsäure gebildet hat, d.h. es entstehen keine weitern niederen Carbonsäuren (vgl. Gaschromatographie von C_2-C_5-Monocarbonsäuren:

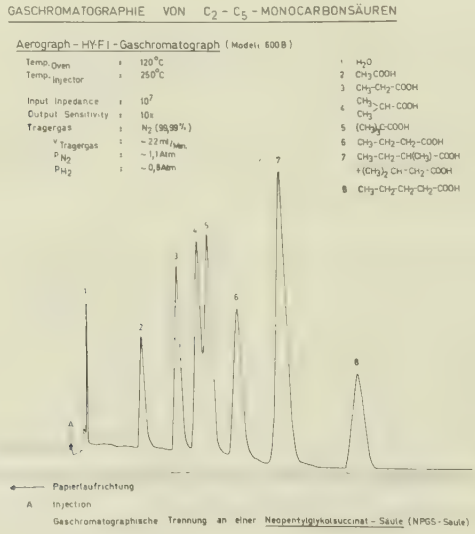


Fig. 6 Chromatographische Identifizierung und Charakterisierung von C_2-C_5-Monocarbonsäuren an einer Neopentylglykolsuccinatsäule.[11)]

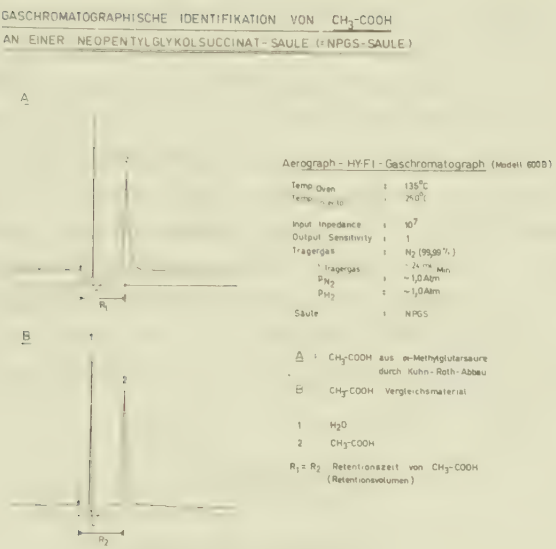


Fig. 7 Chromatographische Identifizierung der Abbau-Essigsäure an einer Neopentylglykolsuccinatsäule.[11)]

Die erhaltene Essigsäure (34) wurde hierauf einem SCHMIDT-Abbau mit NaN_3 und Polyphosphorsäure [38] unterworfen, und das dabei freiwerdende CO_2 (35) als $BaCO_3$ (36), das Methylamin CH_3NH_2 (37) als Pikrat 38 isoliert.

Diese modifizierte Abbausequenz hat den Vorteil, dass sie sowohl für den Versuch mit [3-^{14}C]- als auch [2-^{14}C]-Mevalonsäure brauchbar ist, und dass sich die einzelnen C-Atome spezifisch charakterisieren lassen. In der folgenden

---

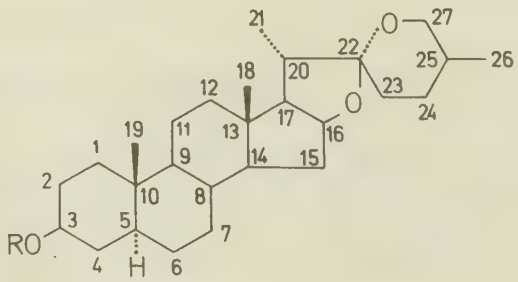
11) Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit einem Aerograph-Hyfi- Gaschromatographen, Modell 600B und einer Neopentylglykolsuccinatsäule durchgeführt (vgl. [43]).

Tabelle 6 sind die durchschnittlichen Ausbeuten der einzelnen Reaktionen des chemischen Abbaus von Tigogenin zusammengestellt. Alle beschriebenen Reaktionen waren reproduzierbar und lassen sich vor allem auch mit den kleinen Substanzmengen, die bei den Versuchen mit radioaktivem Material zu erwarten sind, ohne Schwierigkeiten durchführen. Wie aus den Ausführungen weiter hervorgeht, wurden die meisten Abbaureaktionen in geschlossenen und evakuierten Apparaturen vorgenommen (z.B. SCHMIDT-, KUHN-ROTH-Abbau), da diese für Ansätze im Mikromasstab besonders geeignet sind,und da hierbei die Kontaminationsgefahr auf ein Minimum beschränkt wird.

Tabelle 6

Abbau von Tigogenin

Durchschnittliche Ausbeuten der einzelnen Reaktionen, Erfassung und Charakterisierung der C-Atome Nr. 22 bis Nr.27



12 R=H : Tigogenin
15 R=Ac : 3-O-Acetyl-Tigogenin

Reaktionsstufe		Reaktionsbedingungen	Ausbeute der Theorie %
Tigogenin (12)	→ 3-O-Acetyl-tigogenin (15)	Acetanhydrid-Pyridin 22° / 20 Std.	92 %
3-O-Acetyl-tigogenin (15)	→ Pseudo-tigogenin (16)	1) n-Caprylsäure-Acetanhydrid 250°/ 3 Std. 2) KOH-Methanol-80°/40 Min.	83 %
Pseudo-tigogenin (16)	→ Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18)	1) CrO_3-Eisessig 25° / 1 Std.	51 %
	→ α-Methyl-glutarsäure (19)	2) NaOH-H_2O-Methanol 80-90°/45 Min.	15 - 25 %
α-Methylglutarsäure (19)	→ CO_2 (21) $BaCO_3$ (22) (C-22; C-27)		55 - 60 %
	→ 1,3 Diaminobutan (23) (Pikrat (24) (C-23,24,25,26)	NaN_3/Polyphosphorsäure = PPS 80-90°/1,5 Std.	15 - 20 %
α-Methylglutarsäure (19)	→ CH_3COOH 34	CrO_3/H_2SO_4 125°/ 1,5 Std.	75 %
CH_3COOH (34)	→ CO_2 (35) $BaCO_3$ (36) (C-25)		55 - 60 %
	→ CH_3NH_2 37 Pikrat 38 (C-26)	NaN_3/Polyphosphorsäure = PPS 80-90°/1,5 Std.	40 - 45 %

Es bedeutet : Ac = CH_3CO-
PPS = Polyphosphorsaure

4. Verteilung der Radioaktivität in Tigogenin nach Einbau von [3-^{14}C]-D,L-Mevalonat

Das nach Verabreichung von [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat erhaltene radioaktive Tigogenin (12) (RJ 1) (vgl. Kap. 2.1) wurde acetyliert und das resultierende radioaktive 3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 2) mit inaktivem Material verdünnt (= 3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 3)). Nach Isomerisierung mit n-Caprylsäure-Acetanhydrid [37], Oxidation mit CrO_3-Eisessig und alkalischer Hydrolyse mit NaOH in wässerigem Methanol wurden α-Methylglutarsäure (19) (RJ 4) und Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) (RJ 5) isoliert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde 19 in den Bis-[p-Brom-phenacylester] (20) (RJ 4) übergeführt.

Ueber die Resultate der Radioaktivitätsbestimmung orientiert Tabelle 7 [12].

---

12) Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden von Herrn Dr. F. KALBERER im Isotopenlabor der Firma SANDOZ A.G., Basel, ausgeführt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei. (Vgl. Methodik [44].

Formelschema 7: Biosynthese und Abbau von Tigogenin nach Verabreichung von [3-^{14}C]-D,L-Ammonium-mevalonat

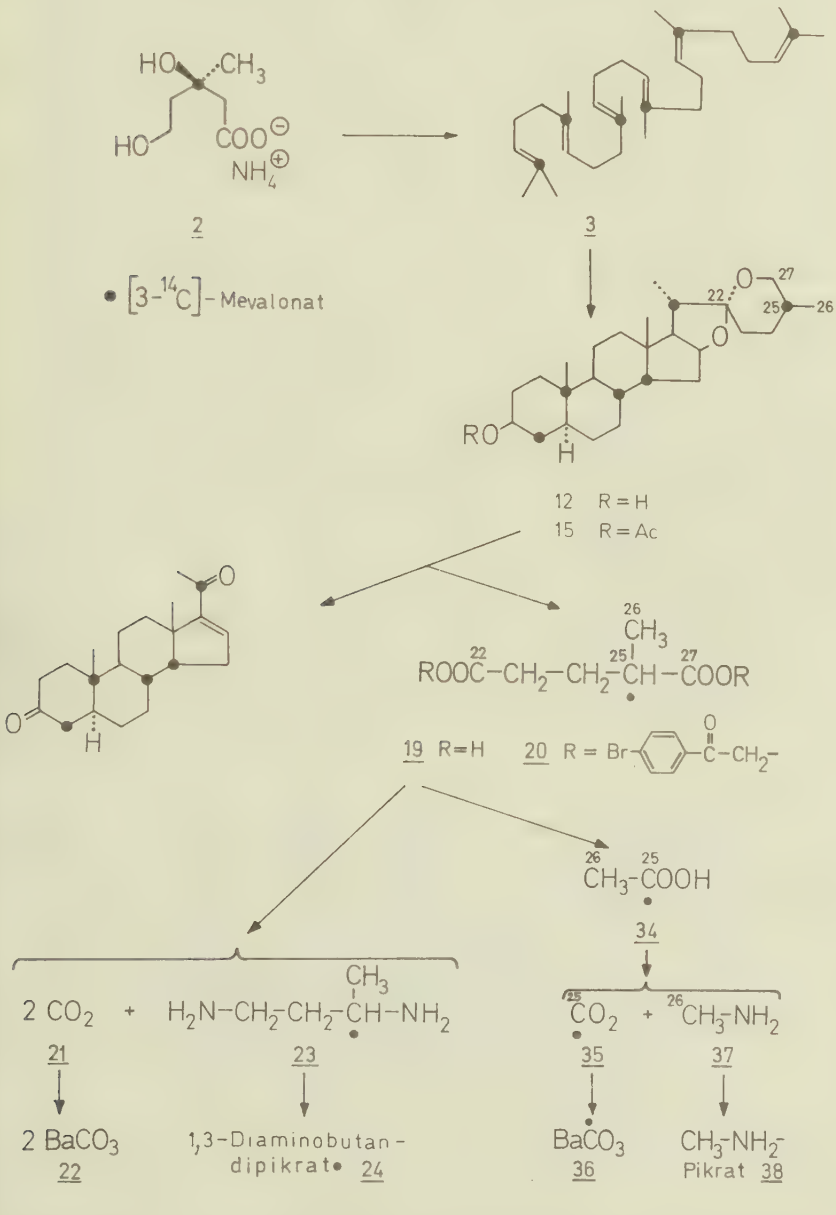


Tabelle 7

[3-^{14}C]-D,L-Mevalonsäure-Tracer-Versuch: Radioaktivitätsbestimmungen

Nr.	Substanzbezeichnung	Mol-Gew.	Radioaktivitäten in dpm gemessen pro mg	Radioaktivitäten in dpm gemessen pro mMol	Radioaktivitäten in dpm berechnet pro mg	Radioaktivitäten in dpm berechnet pro mMol	Relative Radioakt. Ber.	Relative Radioakt. Gef.
RJ 1	Tigogenin $C_{27}H_{44}O_3$	416	31'500	$13{,}1\cdot10^6$	31'500	$13{,}1\cdot10^6$	100 %	100 %
RJ 2	3-O-Acetyl-tigogenin $C_{29}H_{46}O_4$	458	27'900	$12{,}8\cdot10^6$	28'600	$13{,}1\cdot10^6$	100 %	97,8%
RJ 3	3-O-Acetyl-tigogenin $C_{29}H_{46}O_4$	458	7'115	$3{,}260\cdot10^6$	7'140	$3{,}275\cdot10^6$	100 %	100 %
RJ 4	α-Methylglutarsäure-Bis-[p-Brom-phenacyl-ester] $C_{22}H_{20}O_6Br_2$	540	970	$0{,}524\cdot10^6$	1'010	$0{,}546\cdot10^6$	16,7%	16,1%
RJ 5	Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion $C_{21}H_{30}O_2$	314	8'690	$2{,}729\cdot10^6$	8'695	$2{,}730\cdot10^6$	83,3%	84,0%

Nach dem Biogeneseschema (vgl. Formelschema 7) berechnet man für das Verhältnis der Radioaktivitäten von Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19) resp. α-Methylglutarsäure-Bis-[p-Brom-phenacylester] (20) den Wert 5:1. Dieser theoretisch bestimmte Wert stimmt mit dem experimentell bestimmten Ergebnis von 5,1:1 ausgezeichnet überein. Damit ist bewiesen, dass Mevalonat auch in die Spiroketalseitenkette inkorporiert wird.

Um die Radioaktivität in der Spiroketalseitenkette genau zu lokalisieren, haben wir ein zweites Präparat von Tigogenin (12) (RJ 1) wie oben beschrieben in Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) (RJ 9) und α-Methylglutarsäure (19) (RJ 8) übergeführt. Für das Verhältnis der Radioaktivitäten von Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19) wurde diesmal ein Wert von 5,3:1 experimentell bestimmt. Auch die übrigen Werte der Radioaktivität stimmten mit denen des ersten Versuches sehr gut überein.

Die erhaltene α-Methylglutarsäure (19) wurde nach KUHN-ROTH [41] zu $^{26}CH_3^{25}COOH$ (34) oxidiert. Der anschliessende SCHMIDT-Abbau [38] von 34 lieferte radioaktives CO_2 (35) resp. radioaktives $BaCO_3$ (36) (RJ 13) und inaktives CH_3NH_2 (37), das als Pikrat 38 (RJ 12) gefasst wurde.

Andererseits haben wir α-Methylglutarsäure (19) nach SCHMIDT mit NaN_3 und Polyphosphorsäure [38] abgebaut und dabei inaktives CO_2 (31), resp. inaktives $BaCO_3$ (22) (RJ 11) und radioaktives 1,3-Diaminobutan (23), das als Dipikrat 24 (RJ 10) isoliert wurde, erhalten.

Ueber die genauen Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen [12] orientiert die folgende Tabelle 8.

Tabelle 8

[3-^{14}C]-Mevalonsäure-Tracer-Versuch: Radioaktivitätsbestimmungen

Nr.	Substanzbezeichnung	Mol-Gew.	Radioaktivität in dpm gemessen pro mg	Radioaktivität in dpm gemessen pro mMol	Radioaktivität in dpm berechnet pro mg	Radioaktivität in dpm berechnet pro mMol	Fehler %	Relat. Aktivität in % Ber.:	Relat. Aktivität in % Gef.:
RJ 1	Tigogenin	416	31'680	$13{,}20 \cdot 10^6$	31'680	$13{,}20 \cdot 10^6$	--	100	100
RJ 6	3-O-Acetyl-tigogenin	458	29'470	$13{,}49 \cdot 10^6$	28'800	$13{,}20 \cdot 10^6$	2,3	100	102
RJ 7	3-O-Acetyl-tigogenin	458	3'463	$1{,}586 \cdot 10^6$	3'463	$1{,}586 \cdot 10^6$	--	100	100
RJ 9	Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion	314	4'123	$1{,}2946 \cdot 10^6$	4'210	$1{,}322 \cdot 10^6$	2,07	83,3	81,6
RJ 8	α-Methyl-glutarsäure	146	1'620	$0{,}2365 \cdot 10^6$	1'810	$0{,}2642 \cdot 10^6$	10,5	16,7	15,3
RJ 10	1,3-Diamino-butan-Dipikrat	546	500	$0{,}2730 \cdot 10^6$	484	$0{,}2643 \cdot 10^6$	3,3	16,7	17,2
RJ 11	$BaCO_3$	197,7	0	0	0	0	0	0	0
RJ 8	α-Methyl-glutarsäure	146	Für den weitern KUHN-ROTH-Abbau im Verh. 1:1 verdünnt			$0{,}1322 \cdot 10^6$		16,7	15,3
RJ 12	CH_3NH_2-Pikrat	260	0	0	0	0	--	0	0
RJ 13	$BaCO_3$	197,7	660	$0{,}1305 \cdot 10^6$	651	$0{,}1322 \cdot 10^6$	1,4	16,7	16,3

5. Verteilung der Radioaktivität in Tigogenin nach Inkorporation von [2-^{14}C]-D,L-Mevalonat

5.1. Einleitung

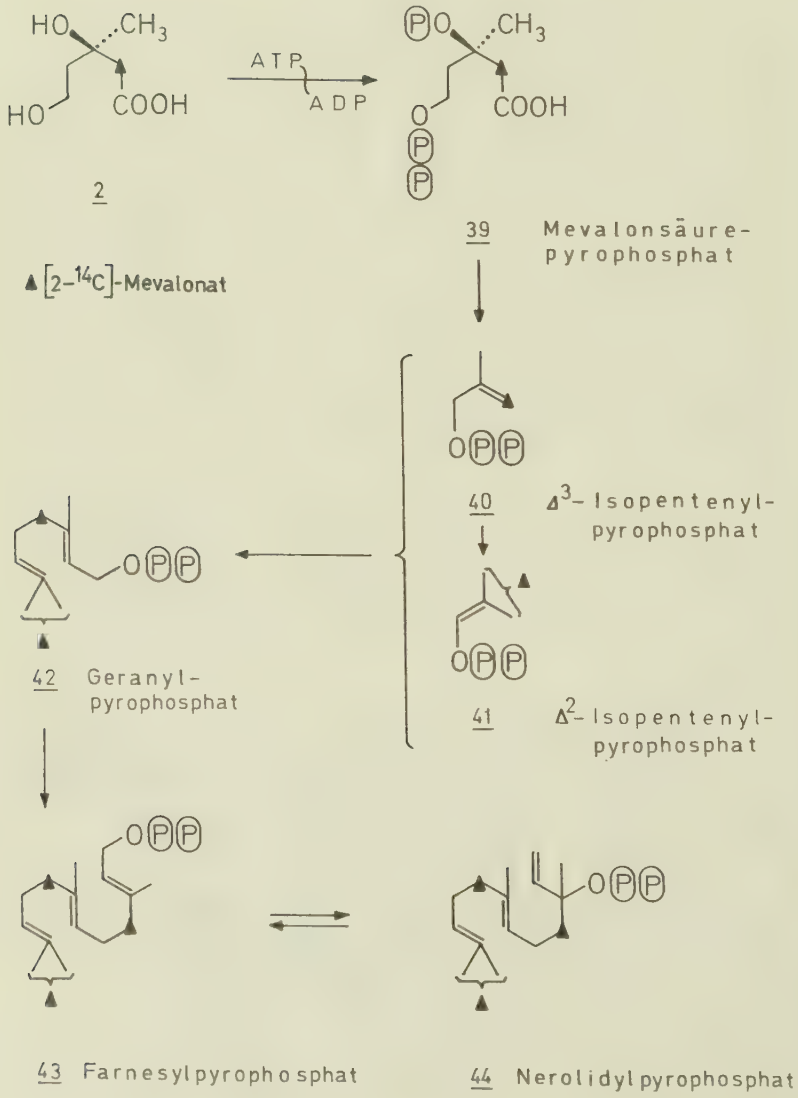
Nach dem generellen Biogenese-Schema, wie es in Formelschema 3 wiedergegeben ist, sind die endständigen, geminalen Methylgruppen der Δ^3-Isopentenylpyrophosphat (4)- und Δ^2-Isopentenylpyrophosphat (41)-Bausteine a priori äquivalent. Diese Aequivalenz der terminalen Methylgruppen pflanzt sich theoretisch durch die ganze Biosynthese-Kette bis zum Squalen (3) fort. Es soll nun abgeklärt werden, ob diese Aequivalenz auch bei der Biogenese der Spirostanole vorliegt, denn die beiden C-Atome Nr. 26 und Nr. 27 der Sapogeninmolekel entsprechen den endständigen Methylgruppen der Isoprenbausteine. Man kann deshalb nicht voraussagen, ob diese Aequivalenz auch praktisch vorliegt, oder ob der Einbau der aktiven Isopren-Einheit stereospezifisch verläuft. Im ersten Fall ist eine Verschmierung der Radioaktivität über die C-Atome Nr. 26 und Nr. 27 zu erwarten. Im zweiten Fall müsste nur eines der beiden C-Atome die gesamte Radioaktivität enthalten, wobei man aber nicht zum voraus weiss, welches die [^{14}C]-Markierung tragen wird.

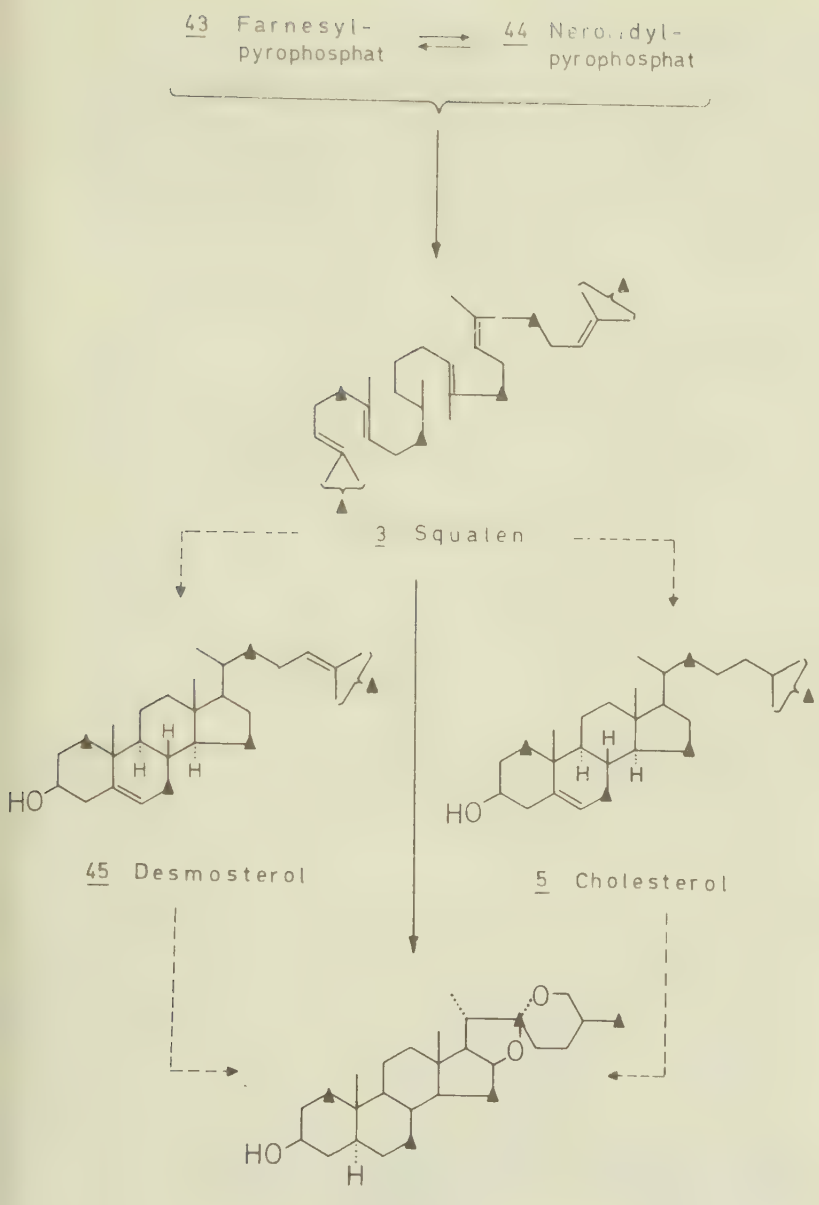
In der Literatur sind mehrere Fälle beschrieben, in denen die Nicht-Aequivalenz derartiger C-Atome festgestellt wurde. Andererseits gibt es auch Beispiele, in denen eine Verschmierung der Radioaktivität stattgefunden hat.

Bevor wir auf die eigenen Versuche eingehen, wollen wir die untersuchten Fälle kurz resumieren.

Formelschema 8

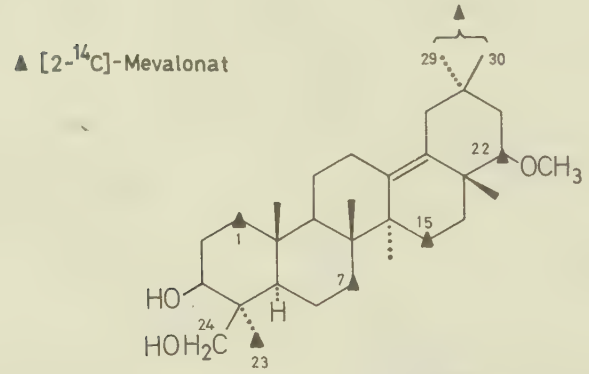
Biogenese der Steroide




43 Farnesyl-Pyrophosphat
44 Nerolidyl-pyrophosphat
3 Squalen
HO
H
H
H
45 Desmosterol
HO
H
H
H
5 Cholesterol
O
O
HO
H
12 Tigogenin

5.1.1. Soyasapogenol-D [45]

D. ARIGONI et al. haben Inkorporationsversuche mit [1-^{14}C]- und [2-^{14}C]-Acetat, sowie [2-^{14}C]-Mevalonat bei Soyasapogenol-D, einem pentacyclischen Triterpen, vorgenommen. Die Frage der Aequivalenz stellt sich für die C-Atome Nr. 23 und Nr. 24 sowie Nr. 29 und Nr. 30.



Soyasapogenol-D

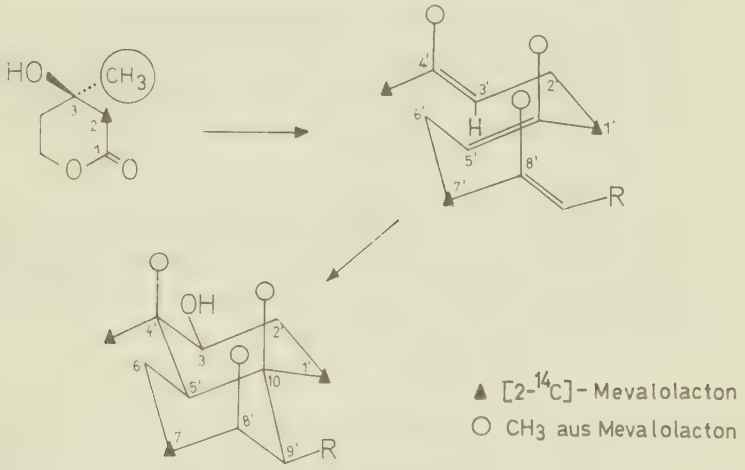
Die Abbauversuche an Soyasapogenol-D nach Einbau von [2-^{14}C]-Mevalonat ergaben, dass C-Atom Nr. 24 inaktiv war und die ursprüngliche Radioaktivität im Pentacyclus nachgewiesen werden konnte.

Die Autoren versuchten, das etwas überraschende Resultat näher zu deuten. Im Rahmen der biogenetischen Isoprenregel muss man schliessen, dass beim Uebergang der Mevalonsäure in Squalen Decarboxylierung und Wasserabspaltung streng stereospezifisch verlaufen, und dadurch nur eine der terminalen Methylgruppen in den Isopreneinheiten radioaktiv markiert ist. Aus stereochemischen Gründen ist diejenige Methylgruppe als radioaktives Zentrum anzusehen, die zum Wasserstoff an C-3' cisoid steht. Man folgert daraus,

dass die Cyclisation zum Ring A ebenfalls streng stereospezifisch und in Sesselfaltung erfolgt (vgl. Schema 9) und dass infolgedessen die terminalen Methylgruppen nicht äquivalent sein können.

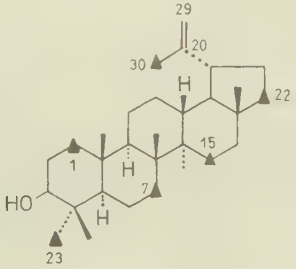
Schema 9

Zur Biosynthese von Soyasapogenol-D



5.1.2. Lupeol [4a] [4f]

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei einem andern pentacyclischen Triterpen, dem Lupeol, nach Einbau von [2-^{14}C]-Mevalonat.



Lupeol

Ein gezielter, oxidativer Abbau mit OsO_4 lieferte inaktiven Formaldehyd (C-29), die ursprüngliche Radioaktivität des Lupeols war im Ringgerüst nach wie vor nachweisbar. In einem andern Abbau konnte gezeigt werden, dass C-30, wie die andern C-Atome Nr. 1, 7, 15, 22 und 23 1/6 der Gesamtaktivität besass.

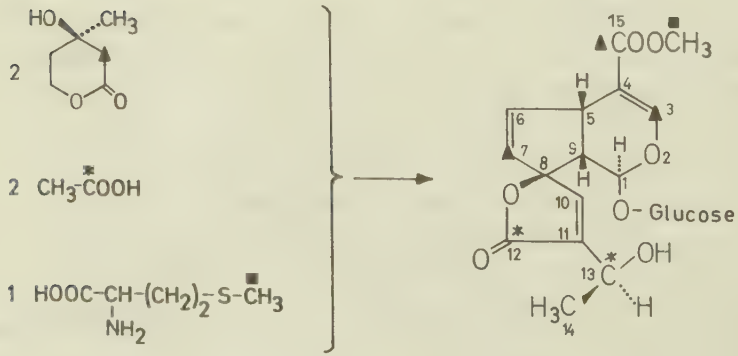
5.1.3. Plumierid

Ganz anders liegen die Verhältnisse beim Plumierid (aus Plumeria acutifolia) [46] und den verwandten terpenoiden Glucosiden Verbenalin (aus Verbena officinalis) [47] und Aucubin (aus Verbena thapsus) [48].

YEOWELL & SCHMID haben bewiesen, dass das C-Skelett des Aglykonteils von Plumierid aus 2 Mevalonat-Bausteinen sowie 2 Acetateinheiten aufgebaut ist. Die Verteilung der Radioaktivität nach Einbau von diversen Precursorn ist aus dem Schema 10 ersichtlich [46].

Formelschema 10

"Biosynthese von Plumierid"



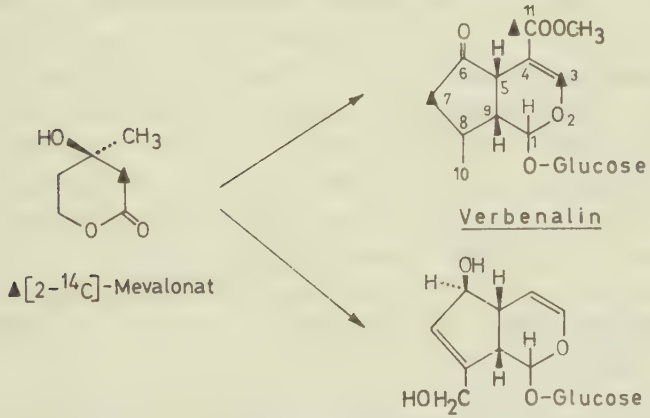
Der Einbau von [2-^{14}C]-Mevalonat erfolgt so, dass die Aktivität zu 50 % in C-7, aber zu je 25 % in den C-Atomen C-3 und C-15 erscheint. Diese Aktivitätsverschmierung über C-3 und C-15 lässt sich damit erklären, dass im Laufe der Biosynthese des Plumierids in einem der mevalonoiden Grundbausteine die Atome C-3 und C-15 äquivalent geworden sind.

5.1.4. Verbenalin und Aucubin [49]

Die Vermutung lag nahe, dass auch die C-Gerüste der mit dem Plumierid eng verwandten terpenoiden Glucoside Verbenalin und Aucubin aus 2 Mevalonsäure-Bausteinen zusammengesetzt sind.

Formelschema 11

"Biosynthese von Verbenalin und Aucubin"



Aus den bisher zugänglichen Resultaten geht hervor, dass, wie beim Plumierid, eine Aktivitätsverschmierung über C-3 und C-11 angenommen werden muss.

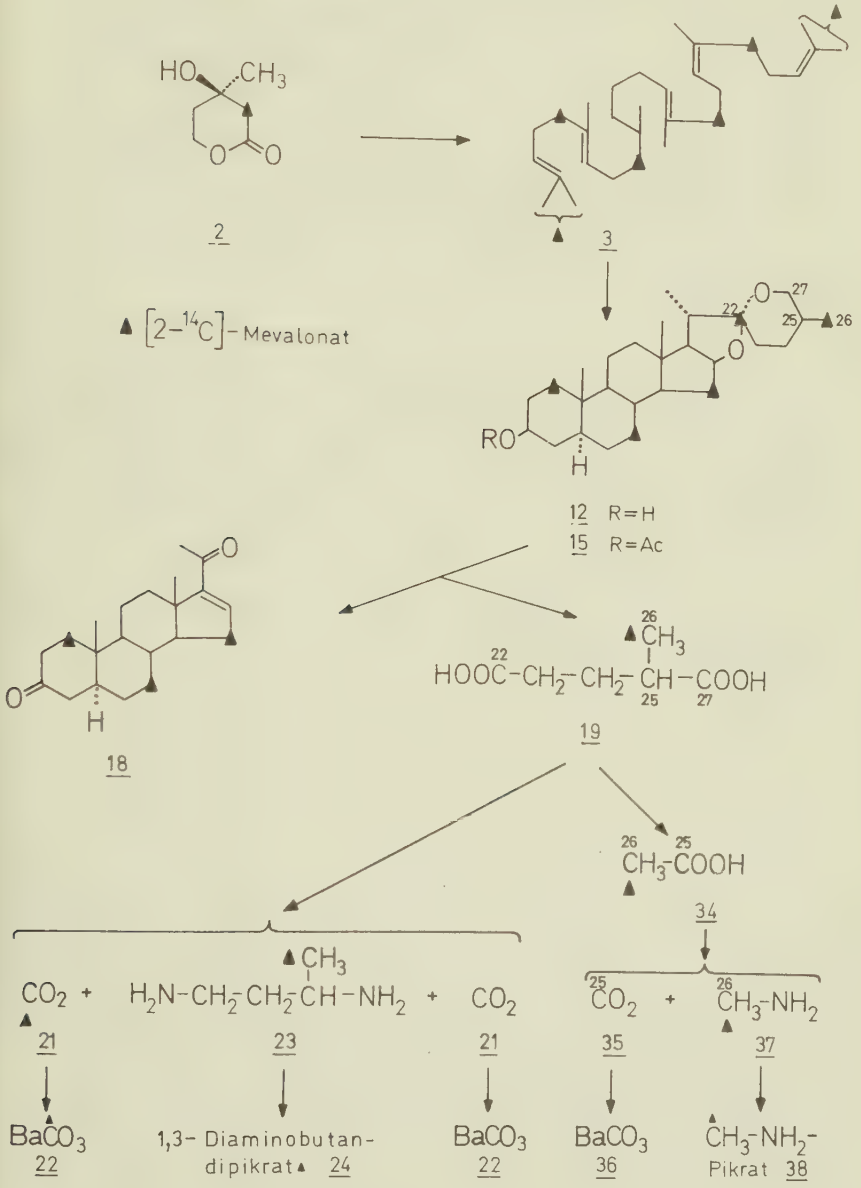
Eine Aktivitätsverschmierung, die, wie wir gesehen haben, auf der Aequivalenz der terminalen Methylgruppen in den Isoprenpyrophosphat-Bausteinen beruht, ist kürzlich bei verschiedenen Indol-Alkaloiden [50] und dem Alkaloid β-Skytanthine [51] beobachtet worden.

5.2. Abbauversuche

Das nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton an Digitalis lanata EHRH. isolierte Tigogenin (12) (RJ 16) wurde nach der üblichen Methode mit Acetanhydrid-Pyridin bei 22° acetyliert. Das anfallende radioaktive 3-O-Acetyl--tigogenin (15) (RJ 17; RJ 18) wurde durch Isomerisierung mit n-Caprylsäure-Acetanhydrid, Oxidation mit CrO_3 in Eisessig und anschliessender alkalischer Hydrolyse mit NaOH in wässerigem Methanol in die Spaltprodukte α-Methylglutarsäure (19) (RJ 20) und Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) (RJ 19) übergeführt. Nach dem generellen Biosyntheseschema, wie es in Formelschema 8 und 12 zusammengestellt ist, erwarteten wir Radioaktivitäten an C-1; C-7; C-15; C-22; C-26 oder und C-27. Wie aus dem Schema leicht ersichtlich ist, muss α-Methylglutarsäure (19) 40 % und Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) 60 % der Radioaktivität enthalten, d.h. das Verhältnis 2:3 betragen. Die experimentell bestimmten, relativen Aktivitäten von α-Methylglutarsäure (19) 38,4 % und Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) 70 %, sowie das Verhältnis der Radioaktivitäten von 2:3,58 stimmen denn auch mit der Theorie gut überein.

Die α-Methylglutarsäure (19) wurde nach KUHN-ROTH [42] zu Essigsäure (34) oxidiert. Ein SCHMIDT-Abbau [38] von 34 lieferte radioaktives CH_3NH_2 (37), das als Pikrat 38 isoliert und bestimmt wurde, und praktisch inaktives CO_2 (35) resp. $BaCO_3$ (36) (RJ 23). Die [^{14}C] Markierung befindet sich deshalb ausschliesslich an C-26.

Formelschema 12: Biosynthese und Abbau von Tigogenin nach Verabreichung von $[2\text{-}^{14}C]$-D,L-Mevalolacton



Weiter wurde die α-Methylglutarsäure (19) einem SCHMIDT-Abbau [38] unterworfen. Dabei konnte radioaktives CO_2 (21) resp. $BaCO_3$ (22) (RJ 21) neben radioaktiven 1,3-Diaminobutan (23), das wiederum als Dipikrat 24 (RJ 22) identifiziert wurde, isoliert werden. Das CO_2 (21) stammte aus den Carboxylgruppen (C-22 und C-27) der eingesetzten α-Methylglutarsäure (19). Da andererseits, wie beschrieben, durch kombinierte KOHN-ROTH- und SCHMIDT-Reaktion die Aktivität in C-26 festgelegt wurde - C-25 und C-27 waren inaktiv - muss die gefundene CO_2-Aktivität aus dem C-Atom Nr. 22 stammen.

Es darf abschliessend bemerkt werden, dass auf Grund der recht guten Uebereinstimmung der experimentellen Werte der Radioaktivitätsbestimmung mit den theoretischen Werten kein Zweifel an der Richtigkeit der postulierten Radioaktivitätsverteilung im Sapogeninmolekül nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton besteht.

Ueber die genauen Ergebnisse der Radioaktivitätsverteilung[12] orientiert Tabelle 9.

Nr.	Substanzbezeichnung	Mol-Gew.	Radioaktivität in dpm gemessen pro mg	pro mMol	Radioaktivität in dpm berechnet pro mg	pro mMol	Fehler %	Relat. Aktivität in % Ber.:	Gef.:
RJ 16	Tigogenin	416	36'200	$15,059 \cdot 10^6$	36'200	$15,059 \cdot 10^6$	--	100	100
RJ 17	3-O-Acetyl-tigogenin	458	32'300	$14,793 \cdot 10^6$	32'880	$15,059 \cdot 10^6$	1,8	100	98,2
RJ 18	3-O-Acetyl-tigogenin	458	1'990	$0,9114 \cdot 10^6$	1'990	$0,9114 \cdot 10^6$	--	100	100
RJ 19	Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion	314	2'100	$0,6594 \cdot 10^6$	1'742	$0,5464 \cdot 10^6$	20	60	70
RJ 20	α-Methyl-glutarsäure	146	2'410	$0,3519 \cdot 10^6$	2'497	$0,3646 \cdot 10^6$	3,5	40	38,6
RJ 21	$BaCO_3$ (C_{22}/C_{27})	197,7	420	$0,0830 \cdot 10^6$	461	$0,09114 \cdot 10^6$	8,9	10	9,2
RJ 22	1,3-Diamino-butan-Dipikrat	546	325	$0,1774 \cdot 10^6$	334	$0,1823 \cdot 10^6$	2,6	20	19,5
RJ 20	α-Methyl-glutarsäure	146	Für den KUHN-ROTH-Abbau im Verhältnis 1:2 verdünnt			$0,1215 \cdot 10^6$	3,5	40	38,6
RJ 23	$BaCO_3$ (C_{25})	197,7	45	$0,0089 \cdot 10^6$	0	0		0	2,3
RJ 24	CH_3NH_2-Pikrat	260	226	$0,0587 \cdot 10^6$	233	$0,0607 \cdot 10^6$	3,2	20	19,3

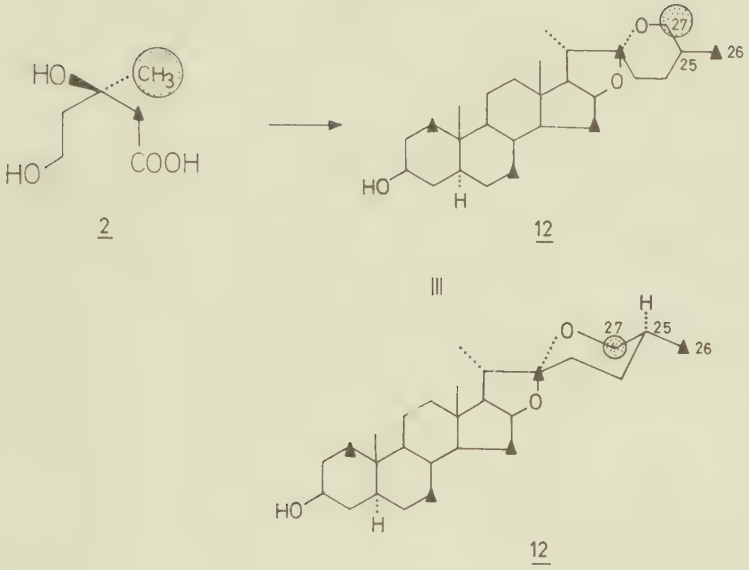
6. Diskussion der Resultate

Aus den Werten der Radioaktivitätsbestimmungen, wie sie in Tabelle 7 und 8 zusammengestellt sind, geht hervor, dass nach Verabreichung von [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat an Digitalis lanata EHRH., Mevalonat (2) sowohl im Steroidteil wie auch in der Spiroketalseitenkette eingebaut wird. Die bestimmten Verhältniszahlen der Radioaktivitäten von Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19) zeigen, dass 6 Mevalonsäure-Bausteine die Spirostanol-molekel aufbauen. Die Spiroketalgruppierung enthält die [^{14}C]-Markierung ausschliesslich an C-25, was mit den Erwartungen in Einklang ist. Man kann daraus schliessen, dass die Biosynthese der Sapogenine über Mevalonat, Squalen, Cholesterol oder ein analoges C_{27}- Sterol erfolgt. Auch die Versuche von R. TSCHESCHE & H. HULPKE [28] und R.D. BENNETT & E. HEFTMANN [24] [25] an Digitalis lanata, Dioscorea spiculiflora und Lycopersicon pimpinellifolium sprechen für diese Sequenz. Unsere Versuche schliessen einen Abbau des C_{27}-Zwischenprodukts und anschliessender Resynthese, wie es bei der Cardenolidbiosynthese (vgl. Kap. I 2.2.) der Fall ist, aus.

Die in Tabelle 9 zusammengestellten Ergebnisse beweisen im weitern, dass nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton an Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen ein stereospezifischer Einbau der [^{14}C]-Markierung des Mevalonsäureprecursors in die C-26-Methylgruppe stattgefunden hat. Es ist keine Verschmierung der Radioaktivität aufgetreten. Aus der Stereospezifität lässt sich weiter ableiten, dass die äquatoriale 26-Methylgruppe des Tigogenins aus C-2 des Mevalonats und die 27-Methylengruppe aus der an C-3 haftenden Methylgruppe des Mevalonats stammen (vgl. Formelschema 13).

Formelschema 13

"Biosynthese der Sapogenine"



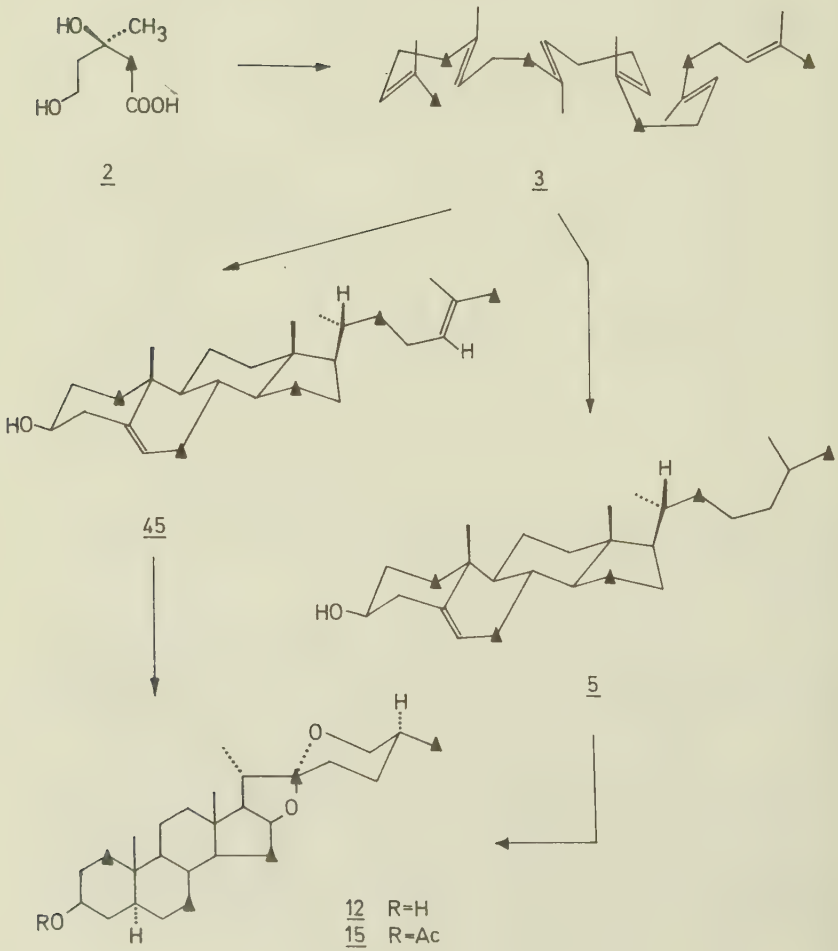
Weiter schliessen wir aus der Nichtäquivalenz der terminalen Methylgruppen in C-26 und C-27, dass der Ringschluss zum Spiroketalsystem streng stereospezifisch erfolgt.

Dies ist verständlich, denn bei C-25 handelt es sich um ein "pro-chirales" Zentrum. Nach welchem Mechanismus die Ringschlussreaktion an diesem nicht-aktivierten C-Atom erfolgt, ist noch völlig ungeklärt. Deshalb kann die Möglichkeit einer Zwischenstufe, die noch die Δ^{24}-Doppelbindung enthält, z.B. des Δ^{24}-Desmosterols (45), nicht ausgeschlossen werden. Sie würde eine selektive enzymatische Hydroxylierung des allylischen C-27 erleichtern. Sie würde von einer stereospezifischen, enzymatischen Hydrierung,

welche zur endgültigen Spiroketalstruktur der Sapogenine führt, gefolgt (vgl. Formelschema 14).

Formelschema 14

"Cyclisation von Squalen"



BENNETT & HEFTMANN [25] haben allerdings gezeigt, dass nach Verfütterung von [^{14}C]-Cholesterol an Dioscorea-Pflanzen radioaktives Diosgenin und Kryptogenin isoliert wurden; weiter haben sie beobachtet [27], dass Pflanzen der Gattung Lycopersicon [^{14}C]-Cholesterol in Neotigogenin (10) und Δ^{16}-5α-Pregnen-3-ol-20-on umzuwandeln vermögen.

TSCHESCHE & HULPKE [28] haben nach Verfütterung von [^{14}C]-Cholesterol an Digitalis-Pflanzen radioaktives Tigogenin (12) und Gitogenin (13) isoliert. Die Autoren haben daraus geschlossen, dass Cholesterol als Zwischenstufe in der Sapogenin-Biogenese anzusehen ist. Unsere Versuche widersprechen diesem Postulat nicht, sie schliessen aber die Δ^{24}-Desmosterol-Zwischenstufe nicht aus, denn Cholesterol oder Cholesterol-Glucosid könnten vorerst zu einem Δ^{24}-Desmosterol-Derivat (45) dehydriert werden. Um dies abzuklären, sind weitere Versuche nötig.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Die Schmelzpunkte sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben zur Messung der spezifischen Drehung, der IR.- und NMR.-Spektren wurden jeweils vor der Messung 2 Std. im Hochvakuum bei 0,01 Torr und 40-100° C (wenn nicht anders vermerkt) getrocknet. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, oder einem BECKMAN-IR.-Spektrophotometer, Modell JR 8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer A-60 im Spektrallaboratorium des org. chem. Institutes der Universität Basel (K. AEGERTER) aufgenommen. Substanzproben zur Elementaranalyse und Radioaktivitätsbestimmung wurden, wenn nicht anders vermerkt, im Hochvakuum bei 0,01 Torr und der angegebenen Zeit und Temperatur getrocknet. Wir verdanken die Analysen dem mikroanalytischen Laboratorium des org. chem. Instituts der Universität Basel (E. THOMMEN). Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden von Herrn Dr. F. KALBERER im Isotopenlabor der Firma SANDOZ A.G., Basel, ausgeführt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei. Die organischen Substanzproben wurden im Sauerstoffkolben verbrannt, das CO_2 in einer methanolischen Aethanolamin-Lösung absorbiert und nach Zusatz von Toluol-Scintillator-Lösung im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen; Methodik vgl. [44].

Zur Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode [35] diente neutrales Al_2O_3 der Aktivitätsstufe I der Firma M. WOELM, Eschwege, oder Kieselgel MERCK der Korngrösse 0,05-0,2 mm, in Anlehnung an die DUNCAN-Methodik [34]. Für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL [52] wurde Kieselgel G der Firma MERCK als Adsorbens und, wenn nicht anders vermerkt, Methylenchlorid, das 0,5-10 % Methanol enthielt, als Fliessmittel gewählt. Für die präparative Dickschicht-

chromatographie [53] wurde Kieselgel PF_{254} MERCK, dem 0,3 % 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium als Fluoreszenzindikator beigemengt wurde, verwendet. Die Flecke wurden im allgemeinen durch J_2-Dämpfe, Steroidsapogenine durch Besprühen mit Chlorsulfonsäure/Eisessig und kurzzeitiges Erwärmen auf 120-130°, Ketone durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin-H_3PO_4-Aethanol-Sprühreagens (gelb-orange Flecken) und Säuren entweder durch Schweppes-Sprühreagens (Anilin-Glucose-Aethanol) oder Phosphormolybdänsäure/Alkohol-Sprühreagens und kurzzeitigem Erwärmen auf 120-130°, sichtbar gemacht [54].

Für die Gaschromatographie diente ein Aerograph-HyFi-Gaschromatograph, Modell 600 B, und als Säule 10 %-Neopentylglykolsuccinat + 2 % H_3PO_4 auf Firebrick 60/80 mesh 5' x 1,8" [43]. Die Methodik wurde von Dr. W. STOECKLIN übernommen, wofür hier bestens gedankt sei.

Uebliches Aufarbeiten bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen des Eindampfrückstandes in Chloroform, Methylenchlorid oder Aether, Waschen mit 2$\underline{\underline{N}}$ HCl (bei CrO_3-Oxidation mit 2$\underline{\underline{N}}$ H_2SO_4), 2$\underline{\underline{N}}$ Na_2CO_3 und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen der Lösung im Vakuum.

Es werden im Text folgende Abkürzungen verwendet:

DC = Dünnschichtchromatographie; GC = Gaschromatographie; LM = Lösungsmittel; Ae = Diäthyläther, An = Aceton; Alk = Aethanol; Be = Benzol; Chf = Chloroform; Md = Methylenchlorid; Me = Methanol; Pä = Petroläther; Py = Pyridin.

2. Isolierung der inaktiven Spirostanole (= Sapogenine) aus Digitalis lanata EHRH.

2.1. Extraktion der Saponine

1 kg getrocknete und staubfein gemahlene Blätter von Digitalis lanata EHRH. (Ernte 1961, SANDOZ A.G., Basel) wurden in 3 l Wasser angeteigt und bei 22° während 20-25 Std. unter gelegentlichem Umrühren geweicht (= fermentiert), worauf der Fermentationsbrei 12-mal mit je 3,0 l Wasser-Alk-Gemischen von steigendem Alk-Gehalt (50 % Alk bis 95 % Alk) extrahiert wurde. Nach Einengen der vereinigten Extrakte am Umlaufverdampfer auf 7 l wurde das Konzentrat zur Entfernung der mitextrahierten Begleitstoffe (Gerbstoffe und Tannine) mit einer alkoholischen $Pb(OH)_2$-Suspension, die frisch aus 1 kg $Pb(OAc)_2 \cdot 3\ H_2O$ durch Fällen mit 2$\underline{N}$ NaOH bereitet worden war, während 20 Min. auf der Maschine geschüttelt. Nach Abnutschen durch ein mit Hyflo-Cellit gedichtetes Filter wurde das dunkelgrün gefärbte Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 6-7 gebracht und im Vakuum auf ca. 2,5 l eingeengt. Nach Zugabe von 5 l 90-proz. Alk wurde vom ausgefallenen $PbSO_4$ abfiltriert und die Stammlösung 3-mal mit Pä ausgeschüttelt. Die Pä-Auszüge (Fette) wurden verworfen. Hierauf wurde die wässerig-alkoholische Stammlösung 6-mal mit je 2 l Chf ausgeschüttelt, die Extrakte im Gegenstromverfahren mit 200 ml H_2O, 2-mal mit 150 ml kalter 2$\underline{N}$ Na_2CO_3 und 2-mal mit 150 ml H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Eindampfen im Vakuum resultierten 17,6 g Chf-Auszug (enthält Cardenolidglykoside).

Die verbliebene wässerige Phase der Stammlösung wurde nochmals im Vakuum auf 1,5 l eingeengt und 26-mal mit 1,0-1,5 l Chf-Alk (3:2) ausgeschüttelt. (Zur Herabsetzung der Löslichkeit der Saponine in der wässerig-alkoholischen Phase wurde 150 g Na_2SO_4 sicc. resp. 10 g Na_2SO_4 sicc. pro

100 ml Lösung zugesetzt). Die vereinigten Extrakte wurden wieder im Gegenstrom 2-mal mit je 150 ml H_2O, mit 150 ml kalter 2$\underline{N}$ Na_2CO_3 und mit 150 ml H_2O gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum wurden 28,12 g rohes Saponingemisch erhalten.

2.2. Hydrolyse des Saponingemisches

3,2 g rohes Saponingemisch wurden mit 32 ml HCl-Eisessig-H_2O (10:35:55)-Gemisch nach KILIANI [33] 1,5 Std. auf 90-100° erhitzt. Hierauf wurde auf das halbe Volumen eingeengt, mit der gleichen Menge H_2O aufgenommen und 4-mal mit Chf-Ae (1:3) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden im Gegenstrom 1-mal mit 10 ml H_2O, 2-mal mit je 5 ml 2$\underline{N}$ Na_2CO_3 und noch 1-mal mit 10 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der schwarzbraune Rückstand (1,250 g) wurde mit 1,5 g KOH in 30 ml Me 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 20 ml H_2O wurde im Vakuum auf 20 ml eingeengt und 4-mal mit Chf-Ae (1:3) ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen Auszüge gaben beim Eindampfen im Vakuum 431 mg rohes Sapogeningemisch. Im DC (Fliessmittel Isopropyläther-Cyclohexan-(2:1)) waren neben verschiedenen Verunreinigungen die 3 Hauptflecke, deren Laufstrecken Tigogenin (Rf 0,60), Gitogenin (Rf 0,22) und Digitogenin (Rf 0,18) entsprachen, zu erkennen.

In analoger Weise wurde die restliche Menge an Rohsaponinextrakt mit HCl-Eisessig-Wasser (10:35:55) nach KILIANI [33] und anschliessender alkalischer Nachhydrolyse mit KOH in Me behandelt. Aus 28,12 g Rohsaponinextrakt resultierten 2,95 g Sapogeningemisch.

2.3. Isolierung von Tigogenin, Gitogenin und Digitogenin

430 mg Rohsapogeningemisch wurden an 70 g Kieselgel MERCK 0,05-0,2 mm nach der Durchlaufmethode [35] chromato-

Tabelle 10

Chromatographie von 430 mg Sapogeningemisch an 70 g Kieselgel MERCK

Fraktion Nr.	Eluierungsmittel	Eindampfrückstand Menge mg	Eindampfrückstand DC; Rf	Kristalle mg	Substanz
1-2	Be	38,5	Rf: 0,81-0,67 UV_{366nm} direkt blau fluoreszierend UV_{254nm} nach Besprühen gut sichtbar	---	
3	Be-Ae- (98: 2)				
4-8	Be-Ae- (88:12)				
9-13	Be-Ae- (80:20)				
14-15	Be-Ae- (75:25)			---	
16-21	Be-Ae- (75:25)	120,3	Rf: 0,6 UV_{366nm} erst nach Besprühen und Entwickeln	94,5	Tigogenin
	Be-Ae- (70:30)				
22-26	Be-Ae- (70:30)	61,2	Rf: 0,54-0,35 UV_{366nm} nach Entwickeln z.T. blau fluoreszierend, z.T. braun-gelb mehrere Flecke uneinheitlich	---	
27-30	Be-Ae- (55:45)				
31-32	Be-Ae- (35:65)				
33-34	Be-Ae- (10:90)				
35-41	Ae				
42-44	Ae-Gem*)-(99: 1)	34,1	Rf ~ 0,3 langgezogene Flecke nach Besprühen zuerst blutrot Im UV_{366nm} z.T. direkt fluoreszierend	---	
45-48	Ae-Gem-(98: 2)				
49-51	Ae-Gem-(97: 3)				
52-58	Ae-Gem-(95: 5)				
59-62	Ae-Gem-(95: 5)	68,9	Rf: 0,25 UV_{366} Nach Entwickeln gelb-braun Rf: 0,20 UV_{366} Nach Entwickeln bläulich fluoreszierend	68,9	Gitogenin
63-68	Ae-Gem-(94: 6)				
69	Ae-Gem-(93: 7)				Digitogenin
70	Ae-Gem-(92: 8)				

Fraktion Nr.	Eluierungsmittel	Eindampfrückstand Menge mg	Eindampfrückstand DC; Rf	Kristalle mg	Substanz
71-72	Ae-Gem-(90:10)	71,2	Rf: 0,15-0	----	nicht weiter untersucht verworfen
73-74	Ae-Gem-(85:15)		langezogene Flecke		
75-	Ae-Gem-(80:20)				
82	Ae-Gem-(20:80)				

*) Gem = Chf-Essigester-Me-(1:1:1)

raphiert. Ueber das Resultat der Trennung orientiert Tabelle 10.

Die Fraktionen 16 - 21 lieferten aus An-Ae-(1:5) 94,5 mg Tigogenin (12) in farblosen Nadeln vom Smp. 205-207°. Die Säulenchromatographie des gesamten Sapogeninmisches (2,95 g) ergab insgesamt 443,4 mg reines Tigogenin vom Smp. 205-207°; $[\alpha]_D^{22} = -66,5° \pm 2°$ (c = 1,0801; Chf). Zur Analyse wurde 10 Std. bei 100° getrocknet.

$C_{27}H_{44}O_3$ (416,6) Ber.C 77,83 H 10,65 % Gef. C 77,77 H 10,93%

Literaturwerte: Smp. 204°; $[\alpha]_D = -67°$ (Chf) [55].

IR.-Spektrum (KBr) u.a. starke Banden bei: 3520, 3400-3200 (breit) 2970-2840, 1450, 1375, 1235, 1170, 1075, 1045, 1035, 975, 950, 915, 895 und 857 cm^{-1}.

3. Isolierung von [^{14}C]-Tigogenin, [^{14}C]-Gitogenin und [^{14}C]-Digitogenin nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton

Am 6. Juni 1966 wurden 29 mg (0,197 mMol) [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton (mit der Gesamtradioaktivität von 1 mC), gelöst in 3 ml H_2O, an 15 ausgesuchte Digitalis lanata EHRH. ("A-Stamm")-Pflanzen verabreicht (SANDOZ A.G., Versuchsgärtnerei Klushof, Aesch). Am 21. Juni 1966 wurden die Blattrosetten abgeschnitten und das gesamte Pflanzenmaterial aufgearbeitet [13].

Die übliche Extraktionsmethodik, wie sie unter Kap. 2 des experimentellen Teils beschrieben wurde, lieferte u.a. 950 mg Spirostanolglykoside enthaltenden Chf-Alk-(3:2)-Auszug mit einer Aktivität von 46'500 dpm/mg.

13) Die Aufarbeitung wurde von Dr. A. LARDON durchgeführt.

Tabelle 11

Chromatographie von 167,2 mg [^{14}C]Sapogenin-gemisch an 27 g SiO_2 (Säulenchromatographie A)

Fraktion Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand Menge mg	DC; Rf	Kristalle mg	Substanz
1-19	Be 100 Be-Ae- (70:30)	9,9	Rf 0,8-0,76 UV direkt fluoreszierend; nicht einheitlich	---	
20-22 23-24	Be-Ae- (70:30) Be-Ae- (60:40)	27,9	RF: 0,62 UV erst nach Besprühen mit Sapogeninreagens identifizierbar	25,0	Tigogenin
25-59	Be-Ae- (60:40) Ae-(100) Ae-Gem*)-(94:6)	30,8	Mittelfraktionen Rf 0,5-0,25 UV direkt fluoreszierend oder erst nach Entwickeln	---	
60-71	Ae-Gem-(92:8) Ae-Gem-(90:10)	53,8	Rf: 0,2-0,18 2 Flecke UV nach Entwickeln fluoreszierend	53,8	Gemisch von Gitogenin & Digitogenin
72-88	Ae-Gem-(90:10) Gem-(100)	39,8	Rf: 0,15-0 langgezogene Flecke	---	

*) Gem = Chf-Essigester-Me-(1:1:1)

Tabelle 12

Chromatographie B der Mischfraktionen
Gitogenin und Digitogenin (53,8 mg) an 16 g SiO_2

Fraktion Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand Menge mg	DC; Rf	Kristalle mg	Substanz
1-3	Isopropyläther[14]-Cyclohexan-(1:1)	2,9	Uneinheitliches Produkt.z.T. im UV direkt fluoreszierend nicht untersucht nicht kristallin	---	
4-8		7,0	Rf: 0,2 einheitlich 1 Fleck (UV)	4,20	Gitogenin
9-10		3,9	Rf: 0,2-0,18 Mischfleck		
11-16		27,0	Rf: 0,18 einheitlich 1 Fleck (UV)	17,3	Digitogenin
17-3o		7,3	langgezogene Flecke nicht weiter untersucht	---	

DC (Fliessmittel): Isopropyläther-Cyclohexan-(2:1)
Revelation : Chlorsulfonsäure-Eisessig-Sprühreagens

Nach Umkristallisieren des Tigogenins (RJ 16) aus An-Ae-(1:5) wurden erhalten: (6 Std. bei 100° getrocknet)

2. Kristallisat Smp. 203-205° 36'500 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 205-206° 35'900 dpm/mg

Gitogenin (RJ 25) kristallisierte aus Chf-Ae in filzigen Nadeln. (10 Std. bei 100° getrocknet).

2. Kristallisat Smp. 270-271° 75'100 dpm/mg

925 mg Chf-Alk-Auszug wurden mit 15 ml HCl-Eisessig-Wasser-(10:35:55)-Gemisch nach KILIANI [33] 1,5 Std. bei 80-100° hydrolysiert. Es wurde wie beschrieben aufgearbeitet und hierauf mit 0,5 g KOH in 10,0 ml Me nachhydrolysiert. Es resultierten 167,2 mg gelb-braunes, amorphes Sapogeningemisch, das an 27,0 g Kieselgel MERCK 0,05-0,2 mm chromatographiert wurde. Ueber das Resultat der Säulenchromatographie A orientiert Tabelle 11.

Die nicht getrennten Mischfraktionen von Gitogenin und Digitogenin (Fraktionen 60 - 71), total 53,8 mg, wurden an 16 g SiO_2 nach DUNCAN [34] im System Isopropyläther[14] -Cyclohexan-(1:1) getrennt. Ueber die Resultate der Säulenchromatographie B orientiert Tabelle 12.

Digitogenin (RJ 26) kristallisierte aus Chf-Ae-Pä in filzigen Nadeln (10 Std. bei 100° getrocknet).

2. Kristallisat Smp.: 295-297° 36'200 dpm/mg.

4. Abbau von inaktivem Tigogenin

Für jede einzelne Abbaureaktion wurde die Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ausbeute durch Reihenversuche durchgetestet. Die meisten wurden in geschlossenen und evakuierten Apparaturen(SCHMIDT- und KUHN-ROTH-Abbau) vorgenommen, da diese für Ansätze im Mikromasstab besonders geeignet sind. Andererseits wird die Radioaktivitätsverschleppung auf ein Minimum reduziert.

---

14) Nach GC erwies sich "Isopropyläther" als Gemisch von: Isopropyläther-Isopropanol-Aceton-(7:1:2).

4.1. 3-O-Acetyl-tigogenin (15) aus Tigogenin (12)

43,0 mg (0,103 mMol) Tigogenin (12) wurden mit 1,5 ml Pyridin und 1,5 ml Acetanhydrid 20 Std. bei 22° stehengelassen. Es wurde mit Eis versetzt. Nach Stehen während 30 Min. ergab das übliche Aufarbeiten 46,0 mg Rohprodukt 15, welches im DC (Fliessmittel Me-Me-(98:2)) praktisch nur einen Fleck (Rf 0,75) zeigte. Aus Isopropanol wurde durch Umkristallisieren 38,0 mg reines 3-O-Acetyl-tigogenin (15) in farblosen Nadeln vom Smp. 201-202° erhalten. $[\alpha]_D^{22}$ = -70,0° ± 2° (c = 1,0585; $CHCl_3$).

Lit.Werte: Smp: 201-203°; $[\alpha]_D$ = - 66° (Chf) [56]
200-202°; $[\alpha]_D$ = - 57° (Py) [57]
206-209°; $[\alpha]_D$ = - 72° (Chf) [58]

IR.-Spektrum (KBr) u.a. starke Banden bei: 2970 - 2820; 1735, 1445, 1370, 1363, 1247, 1235, 1170, 1125, 1045, 1025, 978, 955, 913, 896 und 860 cm^{-1}.

4.2. Pseudotigogenin (16) aus 3-O-Acetyl-tigogenin (15)

150 mg (0,328 mMol) 3-O-Acetyl-tigogenin (15) wurden auf dem Metallbad mit 0,8 ml n-Caprylsäure und 0,25 ml Acetanhydrid auf ca. 150° erwärmt, wobei die niedersiedenden Bestandteile von Wasser, Essigsäure und Acetanhydrid abdestilliert wurden. Anschliessend wurde im N_2-Strom während 3 Std. bei 250° am Rückfluss gekocht. Die leicht gefärbte Lösung wurde in Ae aufgenommen und 2-mal mit 2N NaOH ausgeschüttelt. Die verbliebene Ae-Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wurde mit 4,5 ml 5-proz. KOH in Me während 45 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Verdünnen mit 15 ml heissem Wasser wurde vom amorphen Niederschlag (118 mg) Pseudotigogenin (16) abfiltriert und bei 0,05 Torr und 60° während 8 Std. getrocknet. Aus Me-H_2O wurden 55,0 mg praktisch reines Pseudotigogenin (16) vom Smp. 177-183° erhalten. Lit.Werte: Smp. 179-189° [37]
Smp. 193-196° [59]

IR.-Spektrum (Md) (Beckman JR 8) u.a. Banden bei: 3600, 3460 cm^{-1} (breit); 2980, 2850, 1695, 1600, 1450, 1380-1330, 1160, 1070, 1035, 1015, 955, 920, 860 cm^{-1}.

4.3. Oxidation und Hydrolyse von Pseudotigogenin (16): Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19)

70 mg (0,168 mMol) Pseudotigogenin (16) wurden in 2,5 ml Eisessig gelöst und mit 0,7 ml CrO_3-Oxidationslösung [15] 2 Std. bei Zimmertemperatur unter Rühren stehengelassen. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde 3-mal mit Ae ausgeschüttelt, die vereinigten Ae-Extrakte 1-mal mit Wasser, 2-mal mit 10-proz. $KHCO_3$ und 1-mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der resultierende rohe Ketoester 17 (68 mg) wurde in 1,0 ml Me gelöst und mit 2,0 ml 2N NaOH 2o Min. bei 80° hydrolysiert. Nach Versetzen mit 2,0 ml Wasser wurde die alkalische Lösung so lange mit Ae ausgeschüttelt, bis die Reaktion auf Ketone mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin auf der DC-Platte negativ ausfiel (Weiterverarbeitung der wässerigen Lösung unten).

Die vereinigten Ae-Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 50,2 mg farbloses, rohes krist. Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18). Das Rohprodukt zeigte im DC (Fliessmittel Md-Me-(98:2)) einen UV-aktiven (Uvanalys Fa. HOERNER, 254 nm) Hauptfleck, welcher nach Entwickeln mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagens einen gelb-orangen, scharfen Fleck ergab (Rf 0,66) und 3 unbedeutende, UV-inaktive und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-inaktive Flecke (Rf 0,75; RF 0,6; Rf 0,47).

15) CrO_3-Oxidationslösung: Lösung von 19,32 g CrO_3 in 178,0 ml 90-proz. Eisessig.

50 mg Rohkristallisat 18 wurden an 1,5 g Al_2O_3 der Aktivitätsstufe I (Fa. WOELM) chromatographiert und mit Md, das 2 - 5 % Me enthielt, eluiert. Die mit Md-Me-(96:4) und (95:5) eluierten Fraktionen erwiesen sich nach DC (Fliessmittel Md-Me-(96:?)) als einheitlich und zeigten einen scharf begrenzten Fleck (UV-aktiv, J_2-aktiv, 2,4--Dinitrophenylhydrazin-aktiv). Nach Umkristallisieren aus An-H_2O resultierten 26,8 mg reines krist. Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18). Zur Analyse wurde bei 80-90° 20 Std. getrocknet. Smp.: 206-207°. $[\alpha]_D^{22}$ = + 73,9° ± 2° (c = 1,040; $CHCl_3$). Lit. Werte: Smp.: 205-208°; $[\alpha]_D$ = + 72° (Chf)[60]

Smp.: 204-207° / 207-210° $[\alpha]_D$ = + 72° (Chf)[61]

Smp.: 215-220° $[\alpha]_D$ = + 76° (Chf)[62]

$C_{21}H_{30}O_2$ (314,5) Ber. C 80,21 H 9,62 %
Gef. C 79,80 H 9,64 %

IR.-Spektrum (KBr): scharfe charakteristische Banden bei 1712, 1660 und 1583 cm^{-1}, u.a. Banden bei 2960 cm^{-1} (Schulter), 2930-2850, 1440, 1450 und 1365 cm^{-1}.

Die oben verbliebene alkalische Lösung wurde mit verd. H_2SO_4 und wenigen Tropfen konz. H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion versetzt und im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat 24 Std. mit Ae extrahiert. Der Ae-Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das saure Rohprodukt (19,2 mg) zeigte im DC (Fliessmittel Me-NH_3-(96:4)) mehrere Flecke. Es wurde an 2,5 g Kieselgel MERCK 0,05-0,2 mm chromatographiert. Zur Elution diente Md, das 2-4 % Me und 0,2 % HCOOH enthielt. Die mit Md-Me-HCOOH-(97,8:2:0,2) eluierten Fraktionen, welche erst nach längerem Stehen kristallisierten, zeigten im DC (Fliessmittel Me-NH_3-(96:4)) neben Spuren von Verunreinigung nur einen einzigen, mit Phosphormolybdänsäure-Sprühreagens sichtbar werdenden Fleck (Rf 0,48), welcher der α-Methylglutarsäure entsprach. Zur weiteren Reinigung wurde die rohe Säure bei 0,01 Torr und 100° im Molekularkolben sublimiert. Es

resultierten 4,0 mg, DC einheitliche (Fliessmittel: Me-NH_3-(96:4); Rf 0,48) krist. α-Methylglutarsäure vom Smp. 77,0 - 77,5°.

$C_6H_{10}O_4$ (146,1) Ber. C 49,31 H 6,90 % Gef. C 49,33 H 6,96%

Lit. Werte: Smp.: 78-80° [63], Smp. 81° [55], Smp.: 73-76°[65].

Die durch Abbau erhaltene α-Methylglutarsäure war nach Misch-Smp., IR.-Spektrum identisch mit authentischem Material.

IR.-Spektrum (KBr): breite Bande bei 3600-2500 , 2630 und 2560 cm^{-1} (Schulter). Starke Banden bei: 1685-1690, 1700 cm^{-1} (Schulter), u.a.Banden bei 1465, 1420-1405, 1315-1130 cm^{-1} (verschiedene Banden), 928 und 780 cm^{-1}. NMR.-Spektrum ($CDCl_3$) vgl. Theoretischer Teil, Kap. II. 3.2.

4.4. p-Bromphenacylester (20) der α-Methylglutarsäure (19)

25 mg (0,17 mMol) α-Methylglutarsäure (19) wurden mit 0,17 ml 2,0N NaOH genau neutralisiert und mit 95 mg (0,342 mMol) p-Bromphenacylbromid in 2 ml Alk unter Rückfluss während 2 Std. erhitzt. Die beim Abkühlen ausfallenden Kristalle (40,1 mg) zeigten im DC (Fliessmittel: Md) 3 Flecke, einen relativ schnell laufendenFleck (UV_{254nm}-aktiv, J_2-aktiv und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-aktiv; Rf 0,58) von unumgesetztem p-Bromphenacylbromid, den Hauptfleck des Bis-[p-Brom-phenacyl-esters] 20 (UV_{254nm}-, J_2- und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-aktiv; Rf 0,14) und den Startfleck von unumgesetzter α-Methyl-glutarsäure (19). Umkristallisieren aus abs. Alk. lieferte reinen Ester 20 vom Smp. 98,5-99°. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 60° getrocknet.

$C_{22}H_{20}O_6Br_2$ (540,2) Ber. C. 48,91 H 3,73 %
Gef. C 49,02 H 3,85 %.

Lit. Werte: Smp.: 96-99° [64], Smp.: 101-103° [65]

IR.-Spektrum (KBr) starke Banden bei 1735, 1690, 1580, 1155 und 805 cm^{-1};

u.a. Banden bei: 2970 cm^{-1} (Schulter), 2930, 1476, 1455, 1415, 1392, 1220, 1120, 1063, 1000, 964 und 554 cm^{-1}.

4.5. SCHMIDT-Abbau von α-Methylglutarsäure (19)

45,8 mg (0,314 mM) α-Methylglutarsäure(19) wurden in der von BRITT [38] beschriebenen Apparatur mit 80 mg (1,25 mMol) NaN_3 und ca. 2,4 g Polyphosphorsäure [39] während 1,5 Std. unter öfterm Umschwenken bei 85-90° behandelt. Die für die Absorption des CO_2 verwendete $Ba(OH)_2$-Lösung wurde wie folgt zubereitet: Ausgekochtes, über Quarz redestilliertes H_2O wurde mit einem Ueberschuss von $Ba(OH)_2$ versetzt; 900 ml dieser gesättigten Lösung wurden mit 180 ml 10,75-proz. $BaCl_2$-Lösung gemischt und unter N_2 durch eine Glasfritte filtriert. Das beim SCHMIDT-Abbau ausgefallene $BaCO_3$ wurde abzentrifugiert, zweimal mit bidest. H_2O und zwei- bis dreimal mit H_2O-Me-(1:1) gewaschen und unter der Quarzlampe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dabei wurden 81,2 mg $BaCO_3$ erhalten. (Bei parallel durchgeführten Blindversuchen unter analogen Bedingungen ohne Carbonsäurezusatz betrug die $BaCO_3$-Ausbeute ca. 0,5 mg).

Die phosphorsaure Restlösung wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und mit 10 ml 30-proz. NaOH stark alkalisch gestellt. Zur Vermeidung einer Ausfällung von anorganischen Salzen (Phosphate) wurde die nunmehr alkalische Lösung weiter mit 20 ml H_2O verdünnt und während 20 Std. im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Ae, worin die berechnete Pikrinsäuremenge vorgelegt wurde, extrahiert. Es resultierten 39,8 mg rohes 1,3-Diaminobutan-Dipikrat (24). Das leicht zersetzliche Dipikrat wurde 2-mal aus Wasser umkristallisiert, worauf 17,1 mg reines 1,3-Diaminobutan-Dipikrat (24) in feinen gelben Nadeln oder gelbschimmernden Blättchen vom Smp. 241-245° (Zers.) erhalten wurde. Der Misch-Smp. mit authentischer Probe war gleich. Zur Analyse wurde 4 Std. bei 70° getrocknet.

$C_{16}H_{18}N_8O_{14}$ (546,4) Ber. C 35,17 H 3,32 %
Gef. C 35,23 H 3,25 %

Lit.Werte: Smp.: 245-246° (Zers.) [66]

In einem analog durchgeführten Versuch wurde das Amin 23 im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Ae extrahiert, die Ae-Lösung über Na_2SO_4 getrocknet und im geschlossenen Gefäss im Vakuum eingedampft. Das 1,3-Diaminobutan (23) wurde als stechend riechendes, an der Luft rauchendes Oel gefasst. Destillation im Mikromasstab nach HICKMANN ergab reines, farbloses Oel von 1,3-Diaminobutan (23).

	Gef. Werte	Lit [67]	Lit [66]
Sdp.[16]	137-139°	140,5-141,5°/ 738 Torr	138-141°/ 760 Torr
n	1,4480	1,4528	1,4449
d_{20}^4	0,865	0,860	0,8536

4.6. Oxidative Desaminierung von 1,3-Diaminobutan (23)

100 mg (1,135 mMol) 1,3-Diaminobutan (23) wurden unter Eiskühlung in 1 ml H_2O und 0,5 ml Essigsäure/0,01 ml 1N HCl gelöst und unter intensivem Rühren bei 0° eine wässerige Lösung von 157,0 mg $NaNO_2$ (entsprechend 0,45 ml 5-molare $NaNO_2$-Lösung) zugetropft und 11 Std. weitergerührt. die schwachsaure Lösung wurde im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat 20 Std. mit Md extrahiert und 89,9 mg Oel isoliert. Im DC (Fliessmittel: Md-Me-(9:1)) zeigten sich mehrere J_2- und Phosphormolybdänsäure-aktive Flecke, darunter auch ein mit Phosphormolybdänsäure-Sprühreagens erscheinender Fleck, welcher gleich wie Butan-1,3-diol (Rf 0,25) wanderte.

16) Die Sdp. von 1,3-Diaminobutan und Butan-1,3-diol wurden auf einem METTLER-FP 1-Apparat bestimmt.

Weitere Versuche ergaben ein ähnliches Resultat. Das gesamte Desaminierungsprodukt wurde an Kieselgel MERCK 0,05-0,2 mm chromatographiert. Die mit Md-Me-(9:1) eluierten Fraktionen ergaben reines Butan-1,3-diol (25) in einer Ausbeute von 1 %. 25 zeigte im DC (Fliessmittel Md-Me-(9:1)) nur einen Fleck (Rf 0,25).

	Gef. Werte	Lit. [68]
Sdp. [16]	196,5°	204-205°
n	1,443	1,4418
d	1,0038	1,0053

4.6.1. Bis-(3,5-Dinitrobenzoat) von Butan-1,3-diol (27)

Das aus Me-Md in filzigen Nadeln kristallisierende Bis-(3,5-Dinitrobenzoat) (27) zeigte im DC (Fliessmittel Md) einen im UV-Licht (254 nm), mit J_2- und Phosphormolybdänsäure sichtbaren Fleck (Rf 0,47). Zur Analyse wurde 12 Std. bei 80° getrocknet. Smp. 129,5-130°.

$C_{18}H_{14}N_4O_{12}$ (478,3) Ber. C 45,20 H 2,95 N 11,72 %
Gef. " 45,45 " 3,08 " 11,83 %

Lit.Werte Smp. 134-135° [69].

IR.-Spektrum (KBr): starke Banden bei: 1715, 1620, 1335, 1265, 1155, 720 und 710 cm^{-1}.

4.6.2. Bis-(p-Nitrobenzoat) von Butan-1,3-diol (26)

Auch das aus Alk-Md in feinen Nadeln kristallisierende Bis-(p-Nitrobenzoat) (26) zeigte im DC (Fliessmittel Md) einen im UV-Licht (254 nm), mit J_2- und Phosphormolybdänsäure sichtbaren Fleck (Rf 0,42). Zur Analyse wurde 10 Std. bei 50° getrocknet. Smp. 102,5-103°.

$C_{18}H_{16}N_2O_8$ (388,3) Ber. C 55,67 H 4,15 N 7,21 %
Gef. " 56,13 " 4,25 " 7,19 %

Lit.Werte: Smp. 101-102° [70].

IR.-Spektrum (KBr): starke Banden bei 1715, 1600, 1515, 1465, 1440, 1340, 1325, 1270, 1107, 1095, 1045 und 710 cm^{-1}.

4.7. KUHN-ROTH-Abbau von α-Methylglutarsäure (19)

25 mg (0,171 mMol) α-Methylglutarsäure (19) wurden mit 5,0 ml CrO_3-Oxidationslösung [17] im Bombenrohr bei 125° während 2 Std. erhitzt (Zur Methodik vgl. [42]). (Die sich bildende Essigsäure zersetzt sich erst merkbar bei längerer Einwirkung des Oxidationsgemisches bei 125° oder bei Einwirkung des Oxidationsgemisches bei entsprechend höherer Temperatur). Das Abdestillieren der Essigsäure erfolgte in der von W. SCHOENIGER et al. [71] beschriebenen Apparatur. (Vgl. Fig. 8). Die CrO_3-Oxidationslösung wurde mit wenig Wasser aus dem Bombenrohr in die Apparatur überspült und mit

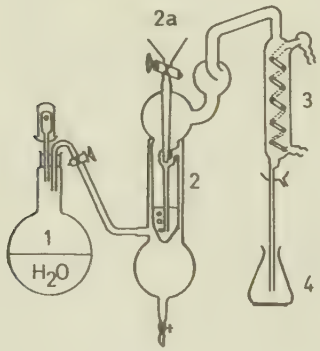


Fig. 8

1 Wasserdampfentwickler

2 Destilliergefäss

2a Zugabe der Bombenrohroxidationslösung

3 Intensiv.-Schlangenkühler

4 Vorlage (100 ml Messzylinder oder 200 ml Erlenmeyer)

gesättigter Na_2SO_4-Lösung bis zum Endvolumen von 15-20 ml nachgewaschen. Die Essigsäure wurde dabei mit dem im Wasser-

---

CrO_3-Oxidationslösung:
100 g CrO_3 + 600 ml H_2O + 125 ml konz. H_2SO_4 (d=1,84).

dampfentwickler erzeugten H_2O-Dampf aus dem Destliergefäss in die Vorlage destilliert. Es wurden 3 Destillate à 100 ml aufgefangen.(Es muss darauf geachtet werden, dass die Beheizung des Wasserdampfentwicklers so eingestellt wird, dass sich innert 10 Min. 100 ml Destillat bilden). Die 3 Destillate wurden einzeln über der freien Flamme 20 Sek. aufgekocht [18] und noch heiss mit genau eingestellter 0,009811 N NaOH gegen Phenolphtalein (3 Tropfen 1-proz.Lösung) auf schwach-rosa Färbung titriert. Die genaue Normalitätsbestimmung der Lauge erfolgte durch Titration gegen $KH(JO_3)_2$- Standard. (=Urtiter) Die unter analogen Bedingungen durchgeführten Blindversuche ohne Carbonsäurezusatz ergaben bei der beschriebenen Destillation Blindwerte von 0,64 ml (1. Destillat à 100 ml) und 0,50 ml (2. und 3. Destillat à 100 ml) verbrauchte 0,009811 N NaOH; diese Blindwerte wurden bei den KUHN-ROTH-Oxidationsversuchen entsprechend berücksichtigt. Unter der Annahme, dass bei CrO_3-Oxidation von α-Methylglutarsäure (19) nur 1 Mol CH_3COOH entsteht, beträgt die Ausbeute an destillierter CH_3COOH (34) 80,6 % der Theorie. Das 1. Destillat enthielt 73 %, das 2. Destillat noch 7,2 % und das letzte Destillat 0,4 % der Essigsäure (34); d.h. die 3. Destillation darf vernachlässigt werden.

Die Destillate wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. (Spuren von H_2O wurden mit Be azeotrop abdestilliert). Es resultierten 12,2 mg amorphes Natriumacetat (34), das für den SCHMIDT-Abbau verwendet wurde.

Bei diesem Abbau von α-Methylglutarsäure (19) entstand ausschliesslich Essigsäure (34). Im Gaschromatogramm (Aerograph-Hify-Gaschromatograph, Modell 600 B, Kolonne: Neopentylglykolsuccinat, Temp.: 135°, LM: H_2O (vgl. Abschn. 1, Allgemeines)) war nur ein einziger peak ersichtlich, der das

---

18) Entfernung des CO_2 nach WIESENBERGER [72].

gleiche Retentionsvolumen resp. die gleiche Retentionszeit zeigte wie Vergleichsessigsäure (vgl. Fig. 5 und Fig. 6).

4.8. SCHMIDT-Abbau von Essigsäure (34)

15,0 mg (0,183 mMol) Natriumacetat (34) (Rohprodukt aus 4.7.) wurden in der von J.J. BRITT [38] beschriebenen Apparatur mit 30 mg (0,46 mMol) NaN_3 und ca. 1,0 g Polyphosphorsäure [39] während 1,5 Std. unter öfterm Umschwenken bei 85-90° behandelt. Das CO_2 (35) wurde in der in 4.5. beschriebenen $Ba(OH)_2$-Lösung absorbiert, das ausgefällte $BaCO_3$ (36) abzentrifugiert und analog mit Wasser, Wasser-Me-(1:1) gewaschen. Nach Trocknen unter einer Quarzlampe bis zur Gewichtskonstanz wurden 19,8 mg $BaCO_3$ (36) erhalten. (Blindversuche ergaben, dass Phenolphtalein (= Indikatorzusatz bei 4.7.) durch HN_3/Polyphosphorsäure nicht abgebaut wird. Vgl. [73]).

Der phosphorsaure Rückstand wurde in 2 ml H_2O aufgenommen und mit 4 ml 30-proz. NaOH versetzt. Die SCHMIDT-Apparatur wurde nun mit einem Mikrokühler und einer Vorlage, worin die berechnete Menge (41,8 mg) Pikrinsäure vorgegeben wurde, ergänzt. Es wurden 2-3 ml wässeriges Destillat aufgefangen, die alkoholische Pikratlösung am Vakuum zur Trockne eingedampft. Unumgesetzte Pikrinsäure wurde mit Be herausgelöst. Nach 2-maligem Umkristallisieren des Rohproduktes (19,2 mg) wurden 11,2 mg reines Methylaminpikrat (38) in goldgelben Blättchen und Quadern vom Smp. 203-206° (Zers.) und 4,8 mg Kristalle vom Smp. 199-203° (Zers.) erhalten. Methylaminpikrat zersetzt sich unter Licht- und Lufteinwirkung augenblicklich. Zur Analyse wurde reines Methylaminpikrat (38) zweimal im Hochvakuum bei 100° und 0,01 Torr sublimiert. Smp. 204-207° (Zers.); ab ca. 160° Sublimation.

$C_7H_8N_4O_6$ (260,2). Ber. C 32,31 H 3,10 % Gef. C 32,57 H 3,09 %

Lit. Werte: Smp. 210° [74]; Smp. 211° [75].

5. Abbau von [^{14}C]-Tigogenin nach Verabreichung von [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat [19].

5.1. Erste Versuchsreihe

5.1.1. [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) aus [^{14}C]-Tigogenin (12)

35,0 mg (0,084 mMol) [^{14}C]-Tigogenin (12) der Aktivität 31'500 dpm/mg ergaben 37,0 mg rohes [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15). Nach Umkristallisieren aus Isopropanol resultierten 34,5 mg krist. [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 2) vom Smp. 200-201°: 27'900 dpm/mg.

32 mg [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 2) wurden mit 96,0 mg inaktivem 3-O-Acetyl-tigogenin (15) verdünnt und mehrmals aus Isopropanol umkristallisiert:

[^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (RJ 3)

2. Kristallisat Smp. 201-202° : 7050 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 201-202° : 9260 dpm/mg
4. Kristallisat Smp. 202° : 7160 dpm/mg

---

19) Die Abbauversuche an radioaktivem Material wurden, wenn nicht besonders darauf hingewiesen, nach den in Kap. 4. (Experimenteller Teil) beschriebenen Methoden durchgeführt. Die radioaktiven Präparate wurden nach DC und Smp. mit authentischem Material verglichen. Soweit genügend Material vorhanden war, wurden 2 - 3 Kristallisate zur Radioaktivitätsbestimmung[12] abgegeben.

5.1.2. [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) aus [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (12)

121 mg (0,264 mMol) [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 3) lieferten 98,8 mg rohes Pseudotigogenin (16), das nach der CrO_3-Oxidation [15] 95,0 mg rohen Ketoester (17) ergab. Hydrolyse mit NaOH in wässerigem Me lieferte nach Extraktion der Hydrolysenlösung mit Ae 43,0 mg rohes [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18). Nach Chromatographie an Al_2O_3 wurden 15 mg DC-einheitliches, amorphes [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) erhalten, welches bis zum konstanten Smp. aus An-Wasser kristallisiert wurde:

[^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (RJ 5):

2. Kristallisat Smp. 203-205° : 8600 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 202-205° : 8780 dpm/mg

Aus der verbliebenen wässerigen Lösung wurde nach Versetzen mit H_2SO_4 und Extraktion mit Ae im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat 20 mg Rohprodukt 19 erhalten, das nach Chromatographie an Kieselgel (SiO_2) 8,9 mg DC-reine α-Methylglutarsäure (19) lieferte. 8,4 mg dieser α-Methylglutarsäure (0,057 mMol) ergaben 18,2 mg p-Bromphenacylester 20, der durch präparative Dickschichtchromatographie [53] (Kieselgel PF_{254}; 20 x 20 Platte) gereinigt und anschliessend aus Alk umkristallisert wurde:

[^{14}C]-α-Methylglutarsäure-Bis-[p-Bromphenacylester] (RJ 4)

1. Kristallisat Smp. 94-95° : 950 dpm/mg
2. Kristallisat Smp. 95-95° : 990 dpm/mg

5.2. Zweite Versuchsreihe

5.2.1. [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) aus [^{14}C]-Tigogenin (12)

35,0 mg (0,084 mMol) [^{14}C]-Tigogenin (12) der Aktivität 31'680 dpm/mg lieferten 36,0 mg praktisch DC-einheitliches [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15). Nach Umkristallisieren aus Isopropanol wurden 34,0 mg krist. [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 6) vom Smp. 200-201° erhalten: 29'470 dpm/mg.

31,0 mg dieses Präparats (RJ 6) wurden mit 233,0 mg inaktiven 3-O-Acetyl-tigogenin (15) verdünnt und wiederum mehrmals aus Isopropanol umkristallisiert:

[^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (RJ 7):

2. Kristallisat	Smp. 201-202°	:	3440 dpm/mg
3. Kristallisat	Smp. 201-202°	:	3460 dpm/mg
4. Kristallisat	Smp. 202°	:	3490 dpm/mg

5.2.2. [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) aus [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15)

257,7 mg (0,56 mMol) [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 7) lieferten 230,9 mg rohes Pseudotigogenin (16). Nach CrO_3-Oxidation [15] resultierten 225,1 mg Ketoester (17), welcher mit NaOH in wässerigem Me hydrolysiert wurde.

Nach Extraktion der Hydrolysenlösung mit Ae resultierten 131,5 mg Rohprodukt von Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18). 21,7 mg von 18 wurden an Al_2O_3 chromatographiert und 11,6 mg amorphes Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) erhalten, welches bis zum konstanten Smp. aus An-Wasser umkristallisiert wurde:

[^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (RJ 9):

1. Kristallisat Smp. 199-202° : 4170 dpm/mg
2. Kristallisat Smp. 200-202° : 4160 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 200-203° : 4040 dpm/mg

Nach Versetzen mit H_2SO_4 und Extraktion im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat wurden aus der verbliebenen, wässerigen Lösung 75 mg Rohprodukt 19 erhalten, welches nach Sublimation im Hochvakuum bei 80-85° und 0,01 Torr 22,9 mg DC-einheitliche, reine α-Methylglutarsäure (19) lieferte:

[^{14}C]-α-Methylglutarsäure (RJ 8):

1. Sublimat Smp. 71-73° : 1620 dpm/mg

5.2.3. SCHMIDT-Abbau von [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19)

9,8 mg (0,0670 mMol) [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden nach der von J. J. BRITT [38] beschriebenen Methode behandelt. Nach üblichem Aufarbeiten (vgl. Kap. 4.5. des exper. Teils) wurden erhalten:
10,7 mg $BaCO_3$ (RJ 11) : 0 dpm/mg
14,7 mg Rohprodukt von 1,3-Diaminobutan-dipikrat (24), das zum konstanten Smp. aus Wasser umkristallisiert wurde.

[^{14}C]-1,3-Diaminobutan-dipikrat (RJ 10)

1. Kristallisat Smp. 240-245° (Zers.) : 485 dpm/mg
2. Kristallisat Smp. 242-245° (Zers.) : 516 dpm/mg

5.2.4. KUHN-ROTH-Abbau von [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19)

8,20 mg [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden mit 6,20 mg inaktiver α-Methylglutarsäure verdünnt. 16,4 mg (0,112 mMol) [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden mit CrO_3-Oxidationslösung nach KUHN-ROTH [42] im Bombenrohr behandelt. Uebliches Aufarbeiten, wie es unter Kap. 4.7.

des exper. Teils beschrieben wurde, lieferte in 70 % Ausbeute CH_3COOH (34) resp. 7,30 mg Natriumacetat.

5.2.5. SCHMIDT-Abbau von CH_3COOH (34)

7,0 mg (0,0854 mMol) Natriumacetat wurden in der von J. J. BRITT [36] beschriebenen Apparatur und Methode mit NaN_3 und Polyphosphorsäure behandelt. Uebliches, unter Kap. 4.8. des exper. Teils beschriebenes Aufarbeiten lieferte 8,78 mg $BaCO_3$ (36).

$[^{14}C]$-$BaCO_3$ (RJ 13): 660 dpm/mg

Destillation des Methylamins (37) in eine Alk-Pikrinsäure-Vorlage ergab 9,2 mg rohes Methylaminpikrat (38), das aus $Alk_{abs.}$ umkristallisiert wurde:

Methylaminpikrat (RJ 12)

2. Kristallisat Smp. 207-210° (Zers.) : 0 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 206-209°(Zers.) : 0 dpm/mg

6. Abbau von $[^{14}C]$-Tigogenin nach Verabreichung von [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton [19].

6.1.1. $[^{14}C]$-3-O-Acetyl-tigogenin (15) aus $[^{14}C]$-Tigogenin (12)

21,1 mg (0,0506 mMol) $[^{14}C]$-Tigogenin (RJ 16) der Aktivität 36'200 dpm/mg ergaben 22,8 mg, nach DC praktisch einheitliches 3-O-Acetyl-tigogenin (15), das aus Isopropanol umkristallisiert wurde:

$[^{14}C]$-3-O-Acetyl-tigogenin (RJ 17):

2. Kristallisat Smp. 202° : 32'300 dpm/mg

19,8 mg $[^{14}C]$-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 17) wurden mit 297,2 mg inaktivem 3-O-Acetyl-tigogenin verdünnt und mehrmals aus Isopropanol umkristallisiert:

[^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (RJ 18):

2. Kristallisat Smp. 200-201,5° : 1990 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 200-201° : 1960 dpm/mg
4. Kristallisat Smp. 202° : 2060 dpm/mg

6.1.2. [^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) aus [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15)

296 mg (0,645 mMol) [^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) (RJ 16) lieferten 227,3 mg Pseudotigogenin (16), das nach CrO_3-Oxidation [15] und anschliessender Hydrolyse mit NaOH in wässerigem Me und nach Extraktion der alkalischen Hydrolysenlösung mit Ae 151,2 mg rohes Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) ergab. 35,4 mg Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) wurden an Al_2O_3 chromatographiert und 16,2 mg DC-einheitliches, reines Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) erhalten, welches zum konstanten Smp. aus An-Wasser umkristallisiert wurde:

[^{14}C]-Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (RJ 19):

1. Kristallisat Smp. 202-204° : 2060 dpm/mg
2. Kristallisat Smp. 201-203,5° : 2130 dpm/mg
3. Kristallisat Smp. 203-204° : 2090 dpm/mg

Aus der verbliebenen wässerigen Lösung wurde nach Versetzen mit H_2SO_4 und Extraktion mit Ae im [illegible]-STAUDEL-Apparat 71,5 mg Rohprodukt 19 erhalten, das nach Sublimation im Hochvakuum bei 60-100° und 0,01 Torr 21,6 mg reine krist. α-Methylglutarsäure (19) lieferte:

[^{14}C]-α-Methylglutarsäure (RJ 20):

2. Sublimat Smp. 74-75° : 2410 dpm/mg

6.2.3. SCHMIDT-Abbau von [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19)

10,1 mg (0,069 mMol) [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden nach der von J. J. BRITT [38] beschriebenen Methode

abgebaut. Uebliches, unter Kap. 4.5. des exper. Teils beschriebenes Aufarbeiten lieferte:

11,4 mg [^{14}C]-$BaCO_3$ (RJ 21): 420 dpm/mg

14,6 mg Konprodukt von 1,3-Diaminobutan-dipikrat (24), das zum konstanten Smp. aus Wasser umkristallisiert wurde.

[^{14}C]-1,3-Diaminobutan-dipikrat (RJ 22):

1. Kristallisat Smp. 240-245° (Zers.) : 320 dpm/mg
2. Kristallisat Smp. 242-246° (Zers.) : 330 dpm/mg
(ab ca. 170° Sublimation)

6.2.4. KUHN-ROTH-Abbau von [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19)

7,19 mg [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden mit 14,38 mg inaktiver α-Methylglutarsäure verdünnt.

21,57 mg (0,147 mMol) [^{14}C]-α-Methylglutarsäure (19) wurden mit CrO_3-Oxidationslösung nach KUHN-ROTH [42] im Bombenrohr behandelt. Uebliches Aufarbeiten, vgl. Kap. 4.7. des exper. Teils, lieferte in 89 % Ausbeute CH_3COOH (34), resp. 11,5 mg Natriumacetat.

6.2.5. SCHMIDT-Abbau von CH_3COOH (34)

11,5 mg (0,140 mMol) Natriumacetat wurden in der von J. J. BRITT [38] beschriebenen Apparatur und Methode mit NaN_3 und Polyphosphorsäure behandelt. Uebliches Aufarbeiten lieferte 20,8 mg $BaCO_3$.

$BaCO_3$ (RJ 23): 45 dpm/mg

Destillation des Methylamins (37) in eine Alk-Pikrinsäure-Vorlage ergab 19,8 mg rohes Methylaminpikrat (38), das aus $Alk_{abs.}$ umkristallisiert wurde:

[^{14}C]-Methylaminpikrat (RJ 24):

2. Kristallisat Smp. 204-207° (Zers.) : 280 dpm/mg

3. Kristallisat Smp. 205-208° (Zers.) : 210 dpm/mg
4. Kristallisat Smp. 206-208° (Zers.) : 490 dpm/mg
5. Kristallisat Smp. 205-208° (Zers.) : 188 dpm/mg
6. Kristallisat Smp. 206-209° (Zers.) : 150 dpm/mg

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren ist die Biosynthese der Cardenolide von Digitalis-Arten weitgehend aufgeklärt worden. Sie geht von Essigsäure aus und führt über die Mevalonsäure zu Squalen, welches zu einem C_{27}-Sterol zyklisiert wird. Letzteres wird zu einem 20-Oxo-Pregnanderivat (21 C-Atome) abgebaut, worauf zur Bildung des Butenolidrings 1 Mol Essigsäure angefügt wird (vgl. Formelschema 4).

Neben den Cardenolid- und Pregnanglykosiden enthalten viele Vertreter der Gattung Digitalis auch Spirostanolglykoside (= Saponine). Ueber die Biosynthese der Saponine und ihrer Aglykone, der Sapogenine, war bis anhin wenig bekannt. Die bisherigen Versuche, wie sie von BENNETT & HEFTMANN an Dioscorea spiculiflora und Lycopersicon pimpinellifolium und von TSCHESCHE & HULPKE an Digitalis lanata durchgeführt wurden, liessen die Mevalonsäure und Cholesterol als biogenetische Vorläufer in der Steroidsapogeninbiosynthese erscheinen. Cholesterol und die Sapogenine besitzen das gleiche C_{27}-Gerüst.

Die Biosynthese der Sapogenine in der Pflanze scheint demnach analog zur Steroidbiogenese im menschlichen und tierischen Organismus zu verlaufen. A priori darf allerdings ein intermediärer Abbau der C_{27}-Zwischenstufe mit anschliessender Resynthese zum Spirostanolmolekül zum mindesten in Digitalis nicht ausgeschlossen werden.

Zur Abklärung dieser Frage sowie zur Bestimmung der genauen Verteilung der Radioaktivität von inkorporierter Mevalonsäure in der Sapogeninmolekel haben wir [3-^{14}C]-D,L-Ammoniummevalonat (2) an ausgesuchte Pflanzen von Digitalis lanata EHRH. ("A-Stamm") verabreicht und neben den Cardenoliden auch radioaktive Saponine erhalten. Nach

saurer Hydrolyse wurden die [^{14}C]-markierten Spirostanole Tigogenin (12), Gitogenin (13) und Digitogenin (14) gewonnen.

[^{14}C]-3-O-Acetyltigogenin (15) wurde nach bekannten Methoden (vgl. theoretischer Teil, Kap. II 4., Seite 44 ff, sowie Formelschema 7) in die Spaltprodukte Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19) übergeführt. SCHMIDT-Abbau (HN_3-PPS) von α-Methylglutarsäure (19) lieferte 2 Mol inaktives CO_2 (21), welches als $BaCO_3$ (22) isoliert wurde, neben radioaktivem 1,3-Diaminobutan (23), das als Dipikrat 24 identifiziert wurde. KUHN-ROTH-Abbau von α-Methylglutarsäure (19) lieferte radioaktive Essigsäure (34), die nach der SCHMIDT-Methode (HN_3-PPS) abgebaut, radioaktives CO_2 (35) resp. $BaCO_3$ (36), neben inaktivem CH_3NH_2 (37), welches als Pikrat 38 identifiziert wurde, lieferte. Damit konnte die [^{14}C]-Markierung eindeutig in C-25 der Spiroketalseitenkette der ursprünglichen Sapogeninmolekel lokalisiert werden. Aus den [^{14}C]-Werten war ferner zu schliessen, dass das Spirostanol-Gerüst aus 6 Mevalonsäure-Einheiten aufgebaut wird und somit ein intermediärer Abbau einer C_{27}-Zwischenstufe mit anschliessender Resynthese in der Biogenese ausgeschlossen werden kann.

Zur Abklärung der Frage des stereospezifischen Einbaus von Mevalonat haben wir in einer zweiten Versuchsreihe [2-^{14}C]-D,L-Mevalolacton an ausgesuchte, junge Digitalis lanata EHRH.-Pflanzen verabreicht, und wiederum die radioaktiven Sapogenine Tigogenin (12), Gitogenin (13) und Digitogenin (14) isoliert.

[^{14}C]-3-O-Acetyl-tigogenin (15) wurde wie in der ersten Versuchsreihe nach bekannten Methoden (vgl. theoretischer Teil, Kap. II. 5., Seite 56 ff. und Formelschema 12) zu Δ^{16}-Pregnen-3,20-dion (18) und α-Methylglutarsäure (19) abgebaut. SCHMIDT-Reaktion (HN_3-PPS) von α-Methylglu-

tarsäure (19) ergab einerseits radioaktives CO_2 (21), das als $BaCO_3$ (22) isoliert wurde, andererseits radioaktives 1,3-Diaminobutan (23), welches als Dipikrat 24 identifiziert wurde. Nach KUHN-ROTH-Abbau von α-Methylglutarsäure (19) erhielten wir radioaktive Essigsäure (34), die nach der SCHMIDT-Reaktion (HN_3-H_2S) praktisch inaktives CO_2 (35), welches wiederum als $BaCO_3$ (36) isoliert wurde, neben radioaktivem CH_3NH_2 (37), welches als Pikrat 38 identifiziert wurde, lieferte.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die ^{14}C-Markierung sich ausschliesslich an C-26 befindet. Es hat infolgedessen ein stereospezifischer Einbau stattgefunden, indem die äquatoriale 26-Methylgruppe aus C-2 der Mevalonsäure stammt. Das C-Atom Nr. 27, welches die Sauerstoffbrücke trägt, entspricht der Methylgruppe der Mevalonsäure. Damit wird die Aequivalenz der terminalen Methylgruppen in den mevalonoiden Bausteinen (Δ^3- und Δ^2-Isopentenylpyrophosphat) ausgeschlossen.

Für die Ueberlassung des Saponinmaterials bin ich Herrn Professor Dr. T. Reichstein zu grossem Dank verpflichtet.

Auch möchte ich es nicht unterlassen, Herrn W. Zürcher und den Herren Dres. A. Lardon und J. von Euw für viele wertvolle Hinweise und Ratschläge zu danken.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] a) STRASBURGER "Lehrbuch der Botanik", bearbeitet von R. HARDER, F. FIRBAS, W. SCHUMACHER & D. von DENFFER, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958

b) C. WEHMER "Die Pflanzenstoffe". Bestandteile und Zusammensetzung der einzelnen Pflanzen und deren Produkte. "Phanerogamen", Bd. 2.

[2] a) A. STOLL & J. RENZ, Verhandlungen der Basler Naturforschenden Gesellschaft 67, No. 2, 492 (1956).

b) T. REICHSTEIN, Angew. Chem. 63, 412 (1951).

c) H. HEUSSER, Fortschr. chem. org. Naturstoffe 7, 67 (1950).

d) CH. TAMM, Fortschr. chem. org. Naturstoffe 13, 137 (1956), ibid 14, 7 (1957).

e) T. REICHSTEIN, Naturwiss. 54, 53 (1967).

[3] L. F. FIESER & M. FIESER, "Steroide", Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 1961.

[4] a) G.E.W. WOLSTENHOLME & M. O'CONNOR; Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill Ldt., London 1959.

b) J.H. RICHARDS & J.B. HENDRICKSON; The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins, W.A. Benjamin, New York 1964.

c) E. STAPLE in P. Bernfeld Edit.; Biosynthesis of Natural Compounds, Pergamon Press Inc., New York 1963.

d) C. DJERASSI in E. Mosettig Edit.; Biochemistry of Steroids, Pergamon Press Inc., New York 1958.

e) G. POPJAK & J.W. CORNFORTH, Advances in Enzymology 22, 281 (1960).

f) L. RUZICKA, Exper. 9, 357-367 (1953), Proc. chem. Soc. 1959, 341-360; Pure and Applied Chemistry 6, No. 4, 493 (1963); International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 1962, Butterworth, London 1963.

g) R.B. CLAYTON, Quart. Rev. 19, 168, 200 (1965).

h) R.B. WOODWARD & K. BLOCH, J.A.C.S. 75, 2023 (1953).

i) A. ESCHENMOSER, L. RUZICKA, O. JEGER & D. ARIGONI, Helv. 38, 1890 (1955).

k) E.C. GROB, Wissensch. Veröffentl. deutsch. Ges. für Ernährung 9, 26 (D. Steinkopf-Verlag, Darmstadt 1963).

l) E. HEFTMANN, Biochemistry of Plant Sterols. Ann Rev. Plant. Physiol. 14, 225 (1963).

m) u.a. L. F. FIESER & M. FIESER, Steroide, 443 (1961) Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

n) J.D. BU'LOCK, The Biosynthesis of Natural Products; McGraw-Hill Publ. Comp. Lim., London/New York/ Toronto/Sidney 1965.

[5] a) M. EBERLE & D. ARIGONI, Helv. 43, 1508 (1960)

b) R.H. CORNFORTH, J.W. CORNFORTH & G. POPJAK, Tetrahedron 18, 1351 (1962).

c) J.D. BRODIE, G. WASSON & J.W. PORTER, J. biol. Chem. 238, 1294 (1963), ibid. 239, 1346 (1964).

[6] a) J.W. CORNFORTH & G. POPJAK, Biochem. J. 58, 403 (1954).

b) F. LYNEN & U. HENNING, Angew. Chem. 72, 8[illegible] (1960).

c) F. LYNEN & M. TADA, Angew. Chem. 73, 513 (1961).

d) F. LYNEN, Angew. Chem 77, 929 (1965).

[6] e) R.B. CLAYTON & K. BLOCH, J. biol. Chem. 218, 305, 319 (1956).

f) T.T. TCHEN & K. BLOCH, J. biol. Chem. 226, 921, 931 (1957); J.A.C.S. 78, 1516 (1956).

g) R.K. MAUGDAL, T.T. TCHEN & K. BLOCH, J.A.C.S. 80, 2589 (1958).

h) J.W. CORNFORTH, R.H. CORNFORTH, A. PELTER, M.G. HORNING & G. POPJAK, Tetrahedron 5, 311 (1959).

i) J.W. CORNFORTH, R.H. CORNFORTH, C. DONNINGER, G. POPJAK, Y. SHIMIZU, S. ICHII, E. FORCHIELLI & E. CASPI, J.A.C.S. 87, 3224 (1965).

[7] a) E.J. COREY, W.E. RUSSEY & P.R. ORTIZ DE MONTELLANO, J.A.C.S. 88, 4750 (1966).

b) idem J.A.C.S. 88, 4751 (1966).

c) E.J. COREY, P.R. ORTIZ DE MONTELLANO, J.A.C.S. 89, 3362 (1967).

[8] a) E.E. van TAMELEN, J.D. WILLETT, R.B. CLAYTON & K.E. LORD, J.A.C.S. 88, 4752 (1966).

b) E.E. van TAMELEN, J.D. WILLETT & R.B. CLAYTON, J.A.C.S. 89, 3371 (1967).

c) E.E. van TAMELEN, K.B. SHARPLESS, J.D. WILLETT, R.B. CLAYTON & A.I. BULINGAME, J.A.C.S. 89, 3920 (1967).

[9] P.D.G. DEAN, P.R. ORTIZ DE MONTELLANO, K. BLOCH & E.J. COREY, J. biol. Chem. 242, 3014 (1967).

[10] E. RAMSTAD & J.L. BEAL, Chemistry and Ind. 1960, 177.

[11] H. GREGORY & E. LEETE, Chemistry and Ind. 1960, 1242.

[12] E.G. GROS & E. LEETE, Chemistry and Ind. 1963, 698.

[13] E. LEETE, H. GREGORY & E.G. GROS, J.A.C.S. 87, 3475 (1965).

[14] E.G. GROS & E. LEETE, J.A.C.S. 87, 3479 (1965).

[15] R. TSCHESCHE, Fortschr. chem. org. Naturstoffe 12, 131 (1955). Edit. L. Zechmeister, Springer-Verlag, Wien).

[16] R. TSCHESCHE, Angew. Chem. 73, 727 (1961).

[17] E. CASPI, D.O. LEWIS, D.M. PIATAK, K.V. THIMANN & A. WINTER, Exper. 22, 506 (1966).

[18] C.W. SHOPEE, R.E. LACK & A.V. ROBERTSON, Proc. chem. Soc. 1962, 65; idem J. chem. Soc. 1962, 3610.

[19] J. VON EUW & T. REICHSTEIN, Helv. 47, 711 (1964).

[20] R. TSCHESCHE & H. MACHLEIDT, Lieb. Ann. Chem. 631, 61 (1960).

[21] R. TSCHESCHE & G. LILIENWEISS, Z. Naturforsch. 19b, 265 (1964).

[22] R. TSCHESCHE, G. WULFF & G. BALLE, Tetrahedron 18, 959 (1962).

[23] R. TSCHESCHE & G. WULFF, Tetrahedron 19, 621 (1963).

[24] R.D. BENNETT & E. HEFTMANN, W.H. PRESTON, J.R. & Jr. HAUN, Arch. Biochem. Biophys. 103, 74 (1963).

[25] R.D. BENNETT & E. HEFTMANN, Phytochemistry 4, 577 (1965).

[26] R.D. BENNETT, E.R. LIEBER & E. HEFTMANN, Phytochemistry, 6, 225 (1967).

[27] R.D. BENNETT, E.R. LIEBER & E. HEFTMANN, Phytochemistry, 6, 837 (1967).

[28] R. TSCHESCHE & H. HULPKE, Z. Naturforsch. 21b, 494 (1966).

[29] R. TSCHESCHE & B. BRASSAT, Z.Naturforsch. 21b, 898 (1966).

[30] Vgl. P.A.G. BALLY, K. MOHR & T. REICHSTEIN, Helv. 35, 45 (1952) und frühere Lit. daselbst.

[31] J. VON EUW & T. REICHSTEIN, Helv. 49, 1468 (1966).

[32] S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, Helv. 32, 939 (1949).

[33] H. KILIANI, Ber. deutsch. chem. Ges. 63, 2866 (1930).

[34] G.R. DUNCAN, J. Chromatogr. 8, 37 (1962).

[35] Vgl. T. REICHSTEIN & C.W. SHOPPEE, Discuss. Farad. Soc. 7, 305 (1949).

[36] a) M.E. WALL, C.R. EDDY, M.L. McLENNAN & M.E.KLUMMP, Analytic. Chem. 24, 1337 (1952); ibid. 25, 266 (1953).

b) A.L. HAYDEN, P.B. SMELTZER & J. SCHEER, Analytic. Chem, 26, 550 (1954).

c) R.N. JONES, E. KATZENELLENBOGEN & K. DOBRINER, J.A.C.S. 75, 158 (1953).

d) R.F. CALLOW, D.H.W. DICKSON, J. ELKS, R.M. EVANS, V.H.T. JAMES, A.G. LONG, J.F. OUGHTON & J.E. PAGE, J. chem. Soc. (London) 1966 (1955).

e) V.H.T. JAMES, J. chem. Soc. (London) 637 (1955).

f) R.K. CALLOW & V.H.T. JAMES, J. chem. Soc. (London) 1671 (1955).

g) M.E. WALL, C.R. EDDY & S. SEROTA, J.A.C.S. 77, 1230 (1955).

[37] A.F.B. CAMERON, R.M. EVANS, J.C. HAMLET, J.S. HUNT, P.G. JONES & A.G. LONG, J. chem. Soc. (London) 2807 (1955).

[38] J.J. BRITT, Diss. ETH Nr. 2948 (ETH Zürich) "Ueber die Biogenese von Rosenonolacton"; Vgl. u.a. Org. Reactions Vol. III 307-336 (Uebersicht) "The Schmidt-Reaction".

[39] Vgl. Herstellung von Polyphosphorsäure: R.C. GILMORE, J.R. & W.J. HORTON, J.A.C.S. 73, 1411 (1951).

[40] HOUBEN & WEYL "Methoden der organischen Chemie", Kap. Amine: Methoden der Umwandlung von Aminen, Bd. II/III. 1958.

[41] K. BOWDEN, I.M. HEILBRON, E.R.H. JONES & B.C.L. WEEDON, J.chem. Soc. (London) 1946, 39.

C. DJERASSI, R. ENGLE & A. BOWERS, J. org. chem. 21, 1547 (1956).

[42] R. KUHN & F. L'ORSA, Angew. Chem. 44, 847 (1931).

PREGL & ROTH: Quantitative organische Mikroanalyse, 7. Aufl. Verlag Springer 1958.

[43] a) I.R. HUNTER, V.H. ORTEGREN & J.W. PENCE, Analytic. Chem. 32, 682 (1960).

b) L.D. METCALF, Nature 188, 142 (1960).

[44] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, Helv. 44, 1956 (1961).

[45] D. ARIGONI, Exper. 14, 153 (1958).

[46] D.A. YEOWELL & H. SCHMID, Exper. 20, 250 (1964).

[47] G. BUECHI & R.E. MANNING, Tetrahedron Letters 26, 5 (1960).

[48] - W. HAEGELE, F. KAPLAN & H. SCHMID, Tetrahedron Letters 1961, 110,
- S. FUJISE, H. OBARA & H. UDA, Chemistry and Ind. 1960, 289,
- J. GRIMSHAW & H.R. JUNEJA, Chemistry and Ind. 1960, 656.

[49] J.E.S. HUENI, H. HILTEBRAND, H. SCHMID, D. GROEGER, J. JOHNE & K. MOTHES, Exper. 22, 656 (1966).

[50] -F. McCAPRA, T. MONEY, A.I. SCOTT & I.G. WRIGHT, Chem. Comm. 537 (1965).
-H. GOEGGEL & D. ARIGONI, Chem. Comm. 538 (1965).
-A.R. BATTERSBY, R.T. BROWN, R.S. KAPIL, A.O. PLUNKETT & J.B. TAYLOR, Chem.Comm. 46 (1966).
-A.R. BATTERSBY, R.T. BROWN, J.A. KNIGHT, J.A. MARTIN & A.O. PLUNKETT, Chem. Comm. 346 (1966).
-P. LOEW, H. GOEGGEL & D. ARIGONI, Chem. Comm. 347 (1966).
-E.S. HALL, F. McCAPRA, T. MONEY, K. FUKUMOTO, J.R. HANSON, B.S. MOOTOO, G.T. PHILLIPS & A.I. SCOTT, Chem. Comm. 348 (1966).

[51] H. AUDA, H.R. JUNEJA, E.J. EISENBRAUN, G.R. WALLER, W.R. KAYS & H.H. APPEL, J.A.C.S. 89, 2476 (1967).

[52] Vgl. E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962; K. RANDERATH, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962.

[53] F.J. RITTER & G.M. MEYER, Nature 193, 941 (1962). C.G. HONEGGER, Helv. 45, 1409 (1962). H. HALPAAP, Chem. Ing. Technik 35, 488 (1963).

[54] Vgl. Anfärbereagenzien für Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie, Edit.: E. MERCK A.G., Darmstadt.

[55] L.F. FIESER & M. FIESER, Steroide, 693 ff (1961).

[56] R. LACK, B.C. NEWMAN & C.W. SHOPPEE, Austral. J. Chem. 16, 696 (1963).

[57] W.A. JACOBS & E.E. FLECK, J. biol. Chem. 88, 545 (1930).

[58] R.K. CALLOW & V.H.T. JAMES, J. chem. Soc. (London) 1671 (1955).

[59] R.E. MARKER & E. ROHRMANN, J.A.C.S. 62, 898 (1940).

[60] A. BUTENANDT, L. MALMOLI & A. HEUSNER, Ber. 72, 1614 (1939).

[61] L. TOLDY, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 16, 403 (1958).

[62] C. KELLER-JUSLEN, Acta Chem. Scand. 18, 750 (1964).

[63] H. WIELAND & F. VOCKE, H. 177, 74 (1928).

[64] R.H. SNYDER, H.J. SHINE, K.A. LEIBBRAND & P.O. TAWNEY, J.A.C.S. 81, 4299 (1959).

[65] H. PINES, N.E. HOFFMAN & V.N. IPATIEFF, J.A.C.S. 76, 4412 (1954).

[66] A.N. KOST, G.A. GOLUBEVA & R.G. STEPANOW, Journal für allg. Chemie UdSSR (Zh. Obshch. Khim) 32, 2240 (1962).

[67] J. TAFEL & A. WEINSCHENK, Ber. 33, 3378 (1900).

[68] Vgl. Handbook of chemistry and physics 45th ed. 1964/65.

[69] TH. BOEHM & H. THIEME, Pharmazie 11, 175 (1956).

[70] R. MOZINGO & K. FOLKERS, J.A.C.S. 70, 227 (1948).

[71] Vgl. W. SCHOENIGER, H. LIEB & M.G.El. DIN IBRAHIM, Mikrochim. Acta (Wien) 96 (1954).

Vgl. W. SCHOENIGER & W. & A. HAACK, Mikrochim. Acta (Wien) 1369 (1956),
u.a. vgl. auch [42].

[72] E. WIESENBERGER, Mikrochem. 33, 51 (1947).

[73] Vgl. Organic Reactions Vol. III "The Schmidt Reaction", S. 307, 314 (1946/47),
vgl. G.CARONNA, Gazz. chim. ital. 71, 189 (1941).

[74] Fr. FICHTER & F. METZ, Helv. 18, 1007 (1938).

[75] J. MITCHELL & W.M.D. BRYANT, J.A.C.S. 65, 129, 136 (1943).

CURRICULUM VITAE

Am 14. April 1940 erblickte ich, Raymond Alex Joly, Bürger von Basel und Noiraigue & Travers (Kanton Neuenburg), Sohn der Trudy Joly geb. Adam und des Jules-Emile Joly, Radiotechniker Radio Studio Basel, in Basel das Licht der Welt.

Von 1947 - 1951 besuchte ich die Primarschule in Basel. 1951 erfolgte der Eintritt ins Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium Basel. Nach 8 Jahren Gymnasialzeit bestand ich 1959 die Maturität und erhielt dabei das Reifezeugnis (Typus C).

Zu Beginn des Sommersemesters 1959 immatrikulierte ich mich an der hiesigen Universität und begann das Studium der Chemie. In den folgenden 5 Jahren legte ich die verschiedenen Zwischenprüfungen ab, 1960 das 1. Vordiplom in Mathematik und Botanik, 1962 das 2. Vordiplom in Physik und Zoologie. Am 30. April 1964 erhielt ich, nach bestandener Prüfung, das Diplom in Chemie.

Gleich anschliessend begann ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm an der Universität Basel mit der Ausarbeitung der Dissertation über die Biosynthese der Steroidsapogenine.

Von 1964 - 1967 war ich auch als Lehrer für Chemie am Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium Basel tätig.

An dieser Stelle möchte ich dem "Stipendienfonds der Schweizerischen Gesellschaft für Chemische Industrie zur Unterstützung von Doktoranden auf dem Gebiete der Chemie" für die Gewährung eines Stipendiums herzlich danken.

Die Ausbildung an der Universität Basel verdanke ich folgenden Herren Professoren und Dozenten:

E. Baumgartner; E. Bonjour; M. Brenner; P. Buchner; H. Dahn; H. Erlenmeyer; A. Ernst; S. Fallab; M. Geiger-Huber; C.A. Grob; P. Huber; W. Kuhn; H. Labhart; A. Marxer; E. Miescher; H. Nüesch; A. Portmann; B. Prijs; T. Reichstein; P. Schiess; H.R. Striebel; Ch. Tamm; M. Thürkauf; R. Wizinger